



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
L Instituto de Ciências da Saúde

***TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ISOAGLUTININAS EM TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS
ABO MINOR INCOMPATÍVEIS***

**Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade
Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e
Saúde Pública – especialidade de Hematologia e Imunohemoterapia**

por

Marta Luísa Moreira Ferreira

Fevereiro de 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

***TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ISOAGLUTININAS EM TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS
ABO MINOR INCOMPATÍVEIS***

**Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade
Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e
Saúde Pública – especialidade de Hematologia e Imunohemoterapia**

por

Marta Luísa Moreira Ferreira

Orientação

Prof. Doutor Elísio Costa

Co-orientação

Dra. Maria Luísa Borregana Lopes dos Santos Teixeira Carrondo

Fevereiro de 2012

*“O único lugar onde o sucesso
vem antes do trabalho é no dicionário.”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Alzira Carvalhais, Directora do Departamento de Imuno-Hemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - E.P.E, pela sua aprovação e interesse demonstrado na realização deste Mestrado.

À Dra. Luísa Santos, Directora do Serviço de Medicina Transfusional do Departamento de Imuno-Hemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - E.P.E, pela receptividade, disponibilidade, apoio e orientação deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Elísio Costa, Professor Auxiliar do Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Católica Portuguesa, pela abertura desta edição do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública com especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia e pela orientação desta dissertação.

À Dra. Beatriz Rebelo, Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública do Serviço de Medicina Transfusional do Departamento de Imunohemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - E.P.E, pela amizade e confiança que depositou em mim e neste trabalho. As suas palavras de ânimo e coragem deram um novo alento para a continuidade do estudo. Também a colaboração técnica na recolha de dados foi uma ajuda essencial, assim como toda a perseverança revelada perante as adversidades com que nos fomos confrontando ao longo de todo o processo.

Aos meus pais, avó e restantes familiares próximos que sempre acreditaram na minha capacidade de concluir mais uma fase no meu desenvolvimento pessoal.

Ao Carlos, pelas palavras de incentivo para iniciar esta etapa e pelo carinho e compreensão que foi demonstrando durante estes dois anos.

À Dulce, pelo carinho e amizade que nos une, mas principalmente pela preciosa ajuda na recta final deste trabalho.

Aos meus amigos, por todo o apoio e encorajamento, mas principalmente pela amizade de longa data que permanece, mesmo à distância.

Aos meus colegas de profissão, enfermeiros do Serviço de Medicina Transfusional do Departamento de Imunohemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - E.P.E e a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A presença de isoaglutininas anti-A e anti-B da classe IgG em concentrados plaquetários pode conduzir a reacções transfusionais hemolíticas devido à transferência passiva destes anticorpos, especialmente quando presentes em alto título. Não existe consenso acerca de qual o título crítico, mas alguma literatura considera valores ≥ 256 como “alto título”. A transferência passiva de isoaglutininas com significado clínico pode ocorrer após transfusão de componentes sanguíneos com incompatibilidade ABO *minor*, ou seja, quando doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB são transfundidos com componentes sanguíneos do grupo O.

O principal objectivo deste trabalho é o de estabelecer o título de anti-A e anti-B da classe IgG a partir do qual a transferência passiva destas isoaglutininas pode ter significado clínico, após transfusão de Concentrados Plaquetários de Aférese (CP-A) do grupo O em doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB. Para tal, foram executados testes em duas etapas independentes mas inter-relacionadas.

Entre 1 de Junho e 30 de Novembro de 2010, foram determinados manualmente os títulos de anti-A₁ e anti-B da classe IgG em todas as unidades de CP-A do grupo O (n=83), colhidos no Serviço de Medicina Transfusional (SMT) do IPO-Porto, com base na metodologia de hemaglutinação em gel, com reagentes e material comercializado pela Diamed®. Foram ainda estudadas as amostras de doentes do grupo A, B ou AB transfundidos com os CP-A cujo título tinha sido determinado (n=21). O Teste de Antiglobulina Directo (TAD) foi realizado em amostras pré-transfusionais e em amostras até 24 horas após a transfusão destes componentes. Nos casos de resultados positivos do TAD, foi determinada a classe do anticorpo existente. Perante um anticorpo da classe IgG, foi realizado um eluado eritrocitário para caracterizar o tipo de isoaglutinina (anti-A₁ e/ou anti-B).

Nos 83 dadores, os títulos de anti-A₁ variaram entre 8 (1,2%) e 2048 (2,4%), com o título 128 como o mais frequente (24,1%). Os títulos de anti-B variaram entre 2 (1,2%) e 1024 (4,8%), com 64 como o valor mais frequente (25,3%). Destes 83 dadores, 21 (25,3%) apresentavam apenas altos títulos de anti-A₁, 8 (9,6%) apresentavam apenas altos títulos de anti-B e 7 (8,4%) apresentavam altos títulos de anti-A₁ e anti-B em simultâneo. Do total de dadores estudados, verificou-se que 36 (43,3%) eram dadores de “alto título” de isoaglutininas. Das 21 amostras de doentes analisadas, 4 revelaram TAD Positivo por IgG após transfusão de CP-A. Destas 4 amostras, apenas 1 revelou a presença de anti-A₁ no eluado eritrocitário. Não foi encontrada qualquer relação entre o título de isoaglutininas e a transição do TAD de negativo a positivo, nem foram relatadas reacções transfusionais hemolíticas após transfusão de CP-A do grupo O. Dos 21 casos, 76,2% responderam com aumento na contagem plaquetária pós-transfusional.

Com este estudo, não foi possível determinar o título crítico de isoaglutininas anti-A₁ e anti-B a partir do qual a transferência passiva adquire significado clínico. No entanto, foi possível identificar que 43,3% dos dadores apresentaram títulos de anti-A₁ e/ou anti-B ≥ 256 , considerados como dadores de alto título.

ABSTRACT

The presence of IgG anti-A and anti-B isoagglutinins in platelet concentrates may lead to hemolytic transfusional reactions due to passive transfer of these antibodies, especially when present in high titer. No international consensus exists on the critical titer, but some literature considers titers ≥ 256 as high titer. The passive transfer of isoagglutinins may occur in blood component transfusions with ABO *minor* incompatibility, that is, when patients from blood groups A, B or AB receive transfusions from blood group O components.

The main goal of this study was to establish the IgG anti-A₁ and/or anti-B isoagglutinin titer from which the passive transfer of isoagglutinins may have clinical meaning, after the transfusion of blood group O Single Donor Platelets (O-SDP's). The performance of two independent but related phases permitted the study.

Between the 1st of June and the 30th of November, 2010, the IgG anti-A₁ and anti-B titers were manually determined on all the O-SDP's donations (n=83) collected in Serviço de Medicina Transfusional (SMT) in IPO-Porto. Patients samples (n=21) of blood groups A, B or AB who received O-SDP's transfusions (for logistic purposes) were also analyzed. The Direct Antiglobulin Test (DAT) was performed in pre-transfusional samples and samples collected 24 hours after transfusion. Observing positive DAT results, the class of the existing antibody was determined. When a positive result was achieved from the IgG antibody, an erythrocyte eluate was performed to characterize the isoagglutinin type (anti-A₁ and/or anti-B).

All the tests were based on the Gel Hemagglutination methodology, with reagents and other material commercialized by Diamed®.

Of the 83 SDP donors, the IgG anti-A₁ titers ranged from 8 (1.2%) to 2048 (2.4%), with 128 as the most frequent (24.1%). The IgG anti-B titers ranged from 2 (1.2%) to 1024 (4.8%), with 64 as the most frequent (25.3%). Of the 83 donors, 21 (25,3%) presented only anti-A₁ high titers, 8 (9,6%) presented only anti-B high titers and 7 (8,4%) presented anti-A₁ and anti-B high titers, simultaneously. Of the 83 donors, 36 (43,3%) were considered as "high titre" donors. Of the 21 samples analyzed, 4 revealed positive DAT by IgG after transfusion. Of these 4 samples, only 1 revealed the presence of anti-A₁ on the Erythrocyte Eluate. No relation was found between the isoagglutinins titer and the transition from negative to positive DAT after the O-SDP transfusion. No hemolytic transfusional reactions were reported after the transfusion. Of the 21 cases, 76.2% responded with an increase of the platelets number.

From this study, it was not possible to determine anti-A₁ and anti-B isoagglutinins critical titres from which the passive transfer may have clinical significance. However, it was possible to identify that 43,3% of the donors presented titers ≥ 256 of IgG anti-A₁ and/or anti-B, considered as high titer donors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGH	Antiglobulina Humana
BCP	Buffy-Coat Platelets
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CP	Concentrado(s) Plaquetário(s)
CP-A	Concentrado(s) Plaquetário(s) de Aférese
DHRN	Doença Hemolítica do Recém-Nascido
DIH	Departamento de Imuno-Hemoterapia
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HPA	Human Platelet Antigens
IPO-Porto	Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil
LISS	Low Ionic Strength Solution
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
RTHA	Reacção Transfusional Hemolítica Aguda
SMT	Serviço de Medicina Transfusional
TAD	Teste de Antiglobulina Directo

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela I – Correspondência entre os antígenos eritrocitários e as isoaglutininas circulantes. ...	4
Tabela II – Indicações para administração de componentes sanguíneos.....	12
Tabela III – Vantagens e desvantagens dos 3 tipos de componentes plaquetários.....	16
Tabela IV– Relatos de reacções transfusionais numa revisão bibliográfica de 2002.....	27
Tabela V - Relatos de reacções transfusionais numa revisão bibliográfica de 2007	29
Fig. 1 – Biosíntese dos antígenos A e B, com base no precursor (substância H)	6
Fig. 2 – Título médio de isoaglutininas anti-A e anti-B, de acordo com a idade.....	8
Fig. 3 – Esquema representativo dos fenómenos de Sensibilização e Aglutinação provocados por anticorpos da classe IgG e IgM, respectivamente.....	10
Fig. 4 – Esquema representativo do mecanismo de funcionamento do Teste de Antiglobulina Directo (TAD).....	25
Fig. 5 – Intensidades de aglutinação macroscópica pela metodologia de hemaglutinação em gel	37
Fig. 6 – Amostra de um dador com título de anti-A ₁ e anti-B de 256 e 32, respectivamente.	41
Fig. 7 – Frequência absoluta dos títulos de isoaglutininas anti-A ₁ da classe IgG.	42
Fig. 8 – Frequência absoluta dos títulos de isoaglutininas anti-B da classe IgG.....	42
Fig. 9 – Títulos de anti-A ₁ (A) e anti-B (B) por grupo sanguíneo dos dadores.	43
Fig. 10 – Títulos de anti-A ₁ e anti-B por género dos indivíduos analisados.	43

ÍNDICE

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	v
Lista de Tabelas e Figuras	vi
Índice.....	vii
Parte I: Estado da Arte	1
Introdução.....	2
1. Sistema Sanguíneo ABO.....	3
1.1 Considerações genéticas	5
1.2 Considerações bioquímicas.....	6
1.3 Considerações serológicas.....	8
1.4 Importância clínica.....	11
2. Antígenos Plaquetários.....	13
2.1. Expressão Plaquetária de antígenos HPA	13
2.2. Expressão Plaquetária de antígenos HLA.....	13
2.3. Expressão Plaquetária de antígenos ABO (ou ABH).....	14
3. Terapêutica Transfusional com Componentes Plaquetários	15
3.1 Componentes Plaquetários Disponíveis	15
3.2 Transfusão de Plaquetas incompatíveis no Sistema ABO	17
4. Transferência Passiva de anticorpos.....	18
5. Reações Transfusionais associadas a Transfusão de Componentes Plaquetários ABO <i>minor</i> Incompatíveis	19
6. Estratégias para redução do risco de reações transfusionais hemolíticas causadas por anticorpos ABO em derivados de plasma.....	20

7.	Métodos Laboratoriais em Imunohematologia	21
7.1	Prova celular, prova directa ou prova globular	22
7.2	Prova reversa ou prova sérica	22
7.3	Titulação de isoaglutininas.....	22
7.4	Teste de Antiglobulina Directo	25
7.5	Eluado eritrocitário.....	26
8.	Análise da Literatura.....	27
 Parte II: Estudo Empírico		32
Objectivos		33
Material e Métodos		35
A) Titulação de Isoaglutininas.....		35
B) Avaliação do significado clínico da Transferência Passiva de isoaglutininas		38
Resultados		41
A) Titulação de isoaglutininas		41
B) Avaliação do significado clínico da Transferência Passiva de Isoaglutininas		44
Discussão		49
Referências Bibliográficas.....		52

PARTE I: ESTADO DA ARTE

INTRODUÇÃO

A terapêutica com componentes sanguíneos é a base da medicina transfusional moderna, sendo a transfusão de componentes plaquetários essencial na prática médica para tratamento ou prevenção da hemorragia no doente trombocitopénico.

Os componentes plaquetários para transfusão podem ser preparados a partir de unidades de sangue total ou a partir de colheitas por aférese de um dador único. A utilização dos diferentes componentes prende-se com questões relacionadas com tecnologias disponíveis, com o volume da produção e disponibilidade de recursos.

A transfusão de plaquetas implica elevado investimento em recursos humanos e económicos, e os ensaios clínicos randomizados que contemplem todos os aspectos clínicos em termos de eficácia e de efeitos adversos são escassos. A prática transfusional, nomeadamente a que envolve componentes plaquetários é essencialmente baseada em evidências e todos os estudos que permitam alguma reflexão sobre esta terapêutica de substituição são bem aceites pela comunidade científica e entendidas como um reforço para a valorização de guias transfusionais.

Referências a fraco incremento plaquetário nas situações de transfusão com incompatibilidade ABO *major* no Sistema ABO, são frequentes na literatura e nas situações de refractariedade à transfusão de plaquetas, tornando-se obrigatória a transfusão de componentes ABO idênticos. Mas o efeito descrito na transfusão com incompatibilidade *minor* (dador de grupo O e receptor de grupo A, B ou AB) e a gravidade associada que tem surgido em relatos, obrigou a comunidade científica a questionar a segurança deste tipo de transfusão.

A publicação, nas últimas décadas, de relatos de casos clínicos relacionados com reacções hemolíticas associadas à transfusão de componentes plaquetários com incompatibilidade *minor* no sistema ABO entre o dador e o receptor levantou a problemática da transfusão plaquetária ABO incompatível. Na realidade, a transfusão de plaquetas incompatíveis no Sistema ABO pode causar a reacções transfusionais hemolíticas agudas com significado clínico não desprezível. Em circunstâncias ideais, os doentes devem ser transfundidos com plaquetas ABO idênticas. No entanto, e não sendo o Sistema ABO uma barreira incontornável para a transfusão de plaquetas, contrariamente ao que acontece na transfusão de eritrócitos, nas situações em que não estão disponíveis componentes isogrupais é consensualmente aceite a transfusão de plaquetas não isogrupais.

A não disponibilidade de plaquetas do mesmo grupo ABO do doente ou a necessidade de gerir adequadamente o inventário de Concentrados de Plaquetas sem desperdício de componentes

por prazo de validade limitado, implica que os serviços de Imunohemoterapia tenham a prática frequente de transfundir doentes do grupo A ou B com plaquetas do grupo O.

As plaquetas exprimem antígenos do sistema ABH em quantidades variáveis mas por vezes com concentrações elevadas. A transfusão de plaquetas com plasma contendo isoaglutininas anti-A ou anti-B incompatíveis com os eritrócitos do receptor podem desencadear uma reacção hemolítica com destruição eritrócitaria e consequências clínicas graves, nomeadamente o choque, a coagulopatia e a insuficiência renal.

Assim é importante que os serviços transfusionais estejam atentos aos doentes que, por razões relacionadas com gestão de inventário, são transfundidos com concentrados plaquetários com incompatibilidade *minor* no sistema ABO e que estabeleçam políticas para este tipo de transfusão.

1. SISTEMA SANGUÍNEO ABO

O sistema sanguíneo ABO foi descoberto em 1900 por Karl Landsteiner. Este investigador combinou várias amostras de sangue e soro entre si, verificando aglutinação apenas em algumas reacções. Com o desenvolvimento de vários estudos, foi capaz de classificar três grupos sanguíneos, agora designados de A, B e O. Em 1910, mostrou-se que o grupo ABO apresenta características hereditárias, em 1950 verificou-se que a sua diferença estrutural se representa por cadeias de oligossacarídeos em glicoproteínas e glicolípidos e, em 1990, foi possível descodificar os genes responsáveis pela síntese dos antígenos ABO ^(1,2).

Os antígenos dos grupos sanguíneos são marcadores de superfície da membrana do eritrócito e consistem em proteínas e carboidratos ligados a lípidos e proteínas. Os antígenos do Sistema ABO são oligossacarídeos que se exprimem de uma forma alargada na membrana do eritrócito mas também noutras células tecidulares, na saliva e noutros fluidos humanos.

O sistema sanguíneo ABO é, não só, determinado pela presença ou ausência de dois antígenos (A e B) à superfície da membrana dos eritrócitos, como também pela presença ou ausência de anticorpos naturais no soro/plasma, designados de isoaglutininas (anti-A e/ou anti-B), que são dirigidos contra os antígenos A e B ausentes. Existe assim uma relação inversa recíproca entre a presença dos antígenos A e B nos eritrócitos e a presença de anti-A e/ou anti-B no soro ⁽¹⁾, como sumariza a tabela I.

Tabela I – Correspondência entre os antígenos eritrocitários e as isoaglutininas circulantes.

Grupo sanguíneo	Antígenos à superfície do eritrócito	Isoaglutininas presentes no soro/plasma circulante
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Sem isoaglutininas circulantes
O	Sem antígenos à superfície	Anti-A e Anti-B (anti-A,B)

Apesar de os antígenos do sistema ABO serem classificados como antígenos eritrocitários, são também expressos por uma grande variedade de tecidos humanos, sendo segregados por células endoteliais e epiteliais do pulmão e intestino, e por células epiteliais do tracto urinário e reprodutivo, como glicoproteínas solúveis ^(1,3,4). Os antígenos A e B formam-se a partir de um antígeno precursor, o antígeno H. Nos indivíduos de fenótipo secretor (Se), os antígenos do sistema ABO podem ser detectados na saliva e noutros fluidos (leite e urina). Cerca de 80% dos indivíduos caucasianos são secretores. As secreções dos indivíduos A contêm antígeno A e H, os indivíduos B contêm antígenos B e H e os indivíduos O contêm quantidades substanciais de antígeno H. Os restantes 20% da população, não-secretores, não produzem antígenos H nem, consequentemente, antígenos A e B ⁽¹⁾.

Os eritrócitos expressam cerca de 2 milhões de antígenos do sistema ABO, e os linfócitos T e B e as plaquetas expressam também antígenos ABO através de antígenos absorvidos do plasma.

O sistema sanguíneo ABO mantém-se o sistema de maior significado clínico na prática transfusional sendo determinante na sobrevivência dos eritrócitos transfundidos e permite avaliar a capacidade de enxerto nas situações de transplante hematopoiético.

É o único sistema sanguíneo no qual os anticorpos presentes no soro/plasma são naturais, ou seja, ocorrem naturalmente no soro de indivíduos sem estimulação antigénica por eritrócitos transfundidos ⁽¹⁾.

1.1 CONSIDERAÇÕES GENÉTICAS

A base do sistema sanguíneo ABO centra-se na expressão de dois antígenos A e B, os produtos indirectos dos alelos A e B do gene ABO ⁽¹⁾. O *locus* ABO encontra-se localizado no cromossoma 9, sendo constituído por 7 exões ⁽⁵⁾. As alterações de aminoácidos que determinam a especificidade de transferases A e B ocorrem no exão 7 ^(1,3). Estas transferases são responsáveis pela adição de monossacarídeos para formação dos respectivos antígenos A e B ^(3,5). Existe ainda um terceiro alelo, o alelo O, que não produz antígenos do sistema ABO.

Os alelos A e B, autossómicos dominantes, codificam glicosiltransferases A e B. O alelo O, autossómico recessivo, codifica uma proteína truncada, que não possui actividade enzimática. Desta forma, não são produzidos antígenos A ou B, mas é produzido o precursor dos antígenos ABO, a substância H (ou antígeno H). Por esta razão, os indivíduos do grupo O expressam grandes quantidades de substância H ^(1,3,6). Pelo facto de não apresentarem antígenos A nem B, considera-se que os indivíduos do grupo O apresentam apenas antígeno H. Por esta razão, os antígenos ABO são por vezes designados como antígenos ABH.

O sistema sanguíneo ABO é composto por quatro fenótipos: A, B, O e AB. O fenótipo A resulta dos genótipos A/A ou A/O, o fenótipo B resulta dos genótipos B/B ou B/O, o fenótipo AB resulta do genótipo A/B e o fenótipo O resulta do genótipo O/O. Apesar de presentes na maioria das populações, a sua frequência varia substancialmente por todo o mundo ⁽¹⁾. Com uma frequência de fenótipo O superior a 60% encontram-se povos nativos das Américas e de algumas zonas de África e Austrália. Pensa-se que originalmente a maioria da população seria do grupo O, mas com a entrada de indivíduos europeus, a frequência deste fenótipo diminuiu. Na Europa, é possível encontrar frequências de indivíduos do grupo A superiores a 60%, especialmente na Escandinávia e algumas zonas da Europa Central. Também em populações aborígenes da Austrália do Sul é possível encontrar altas frequências de fenótipo A, superiores a 77%. O fenótipo B pode ser encontrado em cerca de 40% dos indivíduos da Ásia Central, enquanto na Europa este fenótipo varia entre os 8 e os 12% ⁽¹⁾. Embora existam muitas variações nos fenótipos ABO, a maioria consiste em modificações quantitativas dos antígenos A e B.

1.2 CONSIDERAÇÕES BIOQUÍMICAS

Os antígenos A e B são oligossacarídeos (carboidratos), estruturas associadas a glicolípidos e glicoproteínas das membranas dos eritrócitos ^(2,7). Embora possam ser detectados nos eritrócitos de embriões de 5 a 6 semanas, os antígenos do sistema ABO não estão completamente desenvolvidos até ao nascimento, dado que as estruturas de oligossacarídeos se desenvolvem gradualmente. Este desenvolvimento só se completa entre os 2 e os 4 anos de idade, permanecendo contantes por toda a vida ⁽⁵⁾.

Os oligossacarídeos são cadeias de monossacarídeos. A Fig. 1 esquematiza os passos para a formação dos antígenos A, B e O (ou H). A diferença entre eles reside no monossacarídeo terminal de uma cadeia de três açúcares (galactose-N-acetilglucosamina-galactose). Esta cadeia de três açúcares compõe o precursor do antígeno H (ou substância H).

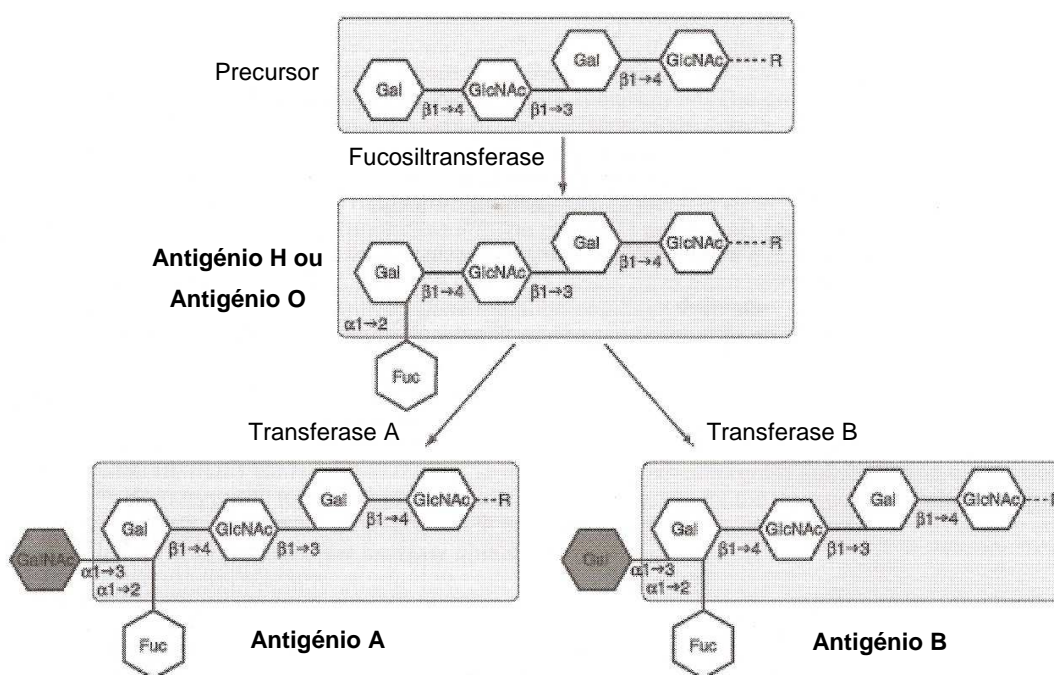


Fig. 1 – Biosíntese dos antígenos A e B, com base no precursor (substância H). Adaptado de Hematology – Basic principles and Practice; R: molécula restante; GlcNAC: N-acetil-D-glucosamina; Gal: Galactose; Fuc: Fucose; GalNAC: N-acetil-galactosamina

Para que se forme o antígeno H (também designado antígeno O), uma enzima denominada fucosiltransferase adiciona um açúcar terminal, a Fucose (Fuc), ao terminal $\alpha 1 \rightarrow 2$ da galactose do precursor. A formação do antígeno A consiste na adição de N-acetilgalactosamina (GalNAC) ao subterminal galactose do antígeno H, na ligação $\alpha 1 \rightarrow 3$. A formação do antígeno B consiste

na adição de galactose (Gal) ao subterminal galactose do antígeno H, na ligação $\alpha 1 \rightarrow 3$. A adição destes açúcares terminais é mediada por transferases A e B, específicas para a formação dos antígenos A e B, respectivamente ⁽¹⁻³⁾.

Os referidos carboidratos são um componente comum a alimentos ingeridos pela espécie humana e a microrganismos da flora normal do intestino (tais como as *Enterobacteriaceae*). Assim, o sistema imune responde a estes antígenos com a produção de uma resposta humoral de anticorpos. No entanto, como os indivíduos não respondem a antígenos que possuem, os indivíduos A não produzem anti-A, os indivíduos B não produzem anti-B e os indivíduos AB não produzem nenhum dos referidos anticorpos. Contrariamente, os indivíduos do grupo sanguíneo O produzem anti-A e anti-B ⁽¹⁾.

Os antígenos A e B podem dividir-se em subgrupos. Estes consistem em fenótipos que diferem na quantidade de antígeno A e B à superfície dos eritrócitos ⁽²⁾. A existência de subgrupos dos antígenos A e B deve-se a mutações nos respectivos genes. Em geral, os subgrupos A são mais comuns que os subgrupos B.

Os dois subgrupos do antígeno A mais frequentes são A₁ e A₂. O fenótipo A₁ representa cerca de 80% dos indivíduos do grupo A, possuindo aproximadamente 1 milhão de epítomos do antígeno A por cada eritrócito. O fenótipo A₂ representa cerca de 20% e possui 1/5 do número de epítomos comparativamente com o fenótipo A₁ ^(1,3,5). Adicionalmente à diferença quantitativa, existe também uma diferença qualitativa entre os fenótipos A₁ e A₂. Cerca de 2% dos indivíduos A₂ e 25% dos indivíduos A₂B produzem um anticorpo designado anti-A₁, que reage com células A₁ e A₁B, mas não com células A₂ e A₂B. Existem ainda subgrupos mais fracos que o A₂, tais como A₃, A_{el} e A_x, que se caracterizam pela diminuição do número de locais de ligação dos antígenos A e aumento da actividade do antígeno H ^(1,3).

Os subgrupos dos antígenos B caracterizam-se pela diminuição dos locais de ligação do antígeno B e aumento da actividade do antígeno H ^(1,3). Por vezes, os antígenos B são adquiridos, situação que resulta da acção da desacetilase, uma enzima bacteriana que remove o grupo acetil do açúcar terminal originário do antígeno A, a N-acetilgalactosamina ⁽³⁾.

Em raras ocasiões, indivíduos do grupo A podem adquirir antígenos B e ser classificados como indivíduos do grupo sanguíneo AB. No entanto, o antígeno B é geralmente fraco, diminuindo também a força do antígeno A. Na maioria dos casos, este fenómeno ocorre em doentes com patologias do sistema digestivo, principalmente carcinoma do cólon ⁽¹⁾.

1.3 CONSIDERAÇÕES SEROLÓGICAS

Os anticorpos contra os antígenos do sistema ABO são conhecidos como **isoaglutininas**. Embora as isoaglutininas anti-A e anti-B sejam referidas como “anticorpos naturais” da classe IgM ^(1-3,5), estes ocorrem nos recém-nascidos como resultado de imunização por substâncias ⁽¹⁾. Provavelmente o estímulo antigénico é ambiental e relaciona-se com a alimentação ou contacto com bactérias ou vírus. Estruturas químicas idênticas ou similares a antígenos eritrocitários são muito comuns na natureza e assim são introduzidas no corpo humano sem ser através de estímulo eritrocitário. O sistema imunitário dos indivíduos reage aos antígenos ambientais produzindo anticorpos contra os antígenos ausentes nos seus eritrócitos. Assim, os anticorpos anti-A são produzidos por indivíduos do grupo B e O e os anticorpos anti-B são produzidos por indivíduos do grupo A e O. Os indivíduos do grupo O possuem os dois tipos de anticorpos (comumente designados como anti-A,B), enquanto os do grupo AB não apresentam anticorpos do sistema ABO em circulação ^(3,5,8).

As isoaglutininas podem ser detectadas no soro humano após os primeiros meses de vida de um indivíduo. No entanto, o título de isoaglutininas anti-A e/ou anti-B varia ao longo da vida. A produção de isoaglutininas vai aumentando até atingir os níveis de adulto por volta dos 5 a 10 anos de idade, decrescendo posteriormente com o decorrer da idade, como mostra a Fig. 2. Na idade adulta, em média, os níveis de isoaglutininas variam entre 4 e 2048 (ou superior) ^(1,8).

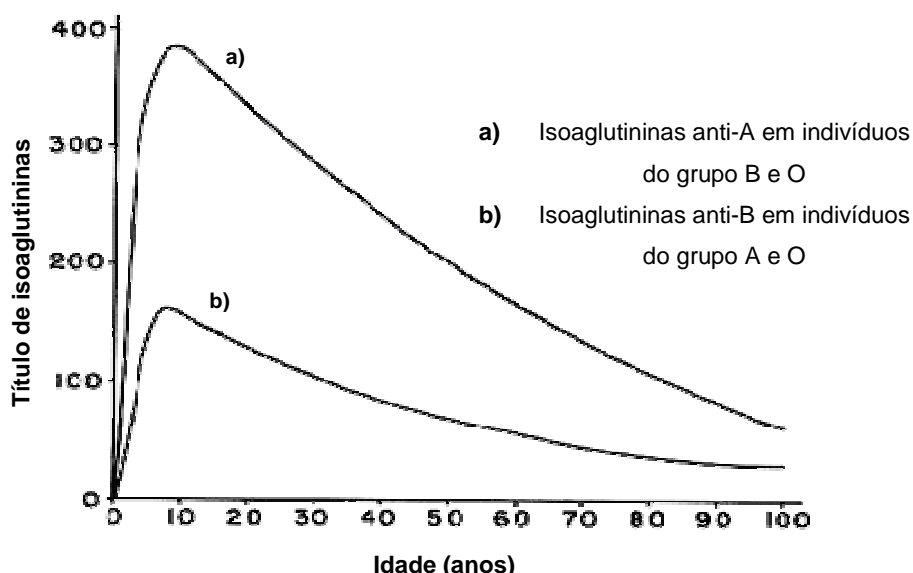


Fig. 2 – Título médio de isoaglutininas anti-A e anti-B, de acordo com a idade. Adaptado de Adewuyi JO, Gwanzura C., Mvere D. Characteristics of Anti-A and Anti-B in black Zimbabweans. Vox Sang 1994;67(3):307-309

As isoaglutininas anti-A e anti-B são imunoglobulinas. As imunoglobulinas de maior significado clínico são as IgM e as IgG. Nos indivíduos do grupo A ou B, as isoaglutininas são predominantemente da classe IgM e nos indivíduos do grupo O predominam as imunoglobulinas da classe IgG ^(1,3). Ambas as classes de imunoglobulinas (IgM e IgG) aglutinam os eritrócitos preferencialmente à temperatura ambiente (20-24°C) e activam o sistema de complemento a 37°C, adquirindo capacidades líticas ^(1,8).

As isoaglutininas anti-A e anti-B da classe IgM possuem a capacidade de aglutinar os eritrócitos e conduzir a hemólise intravascular com consequente morte dos indivíduos. No entanto, como resultado de imunização por gravidez ou por transfusão de componentes sanguíneos incompatíveis, o título de anticorpos da classe IgG pode aumentar ^(1,6).

IgM

As IgM são a primeira classe de imunoglobulinas, produzidas pelo linfócito B maduro na resposta imune primária. Por serem detectáveis no soro alguns meses após o nascimento, os anticorpos do sistema ABO são considerados “anticorpos naturais”. Estruturalmente, são moléculas pentaméricas, constituídas por 5 monómeros ligados por pontes dissulfídicas, que se ligam aos antígenos da superfície dos eritrócitos formando agregados, processo designado por aglutinação.

A **aglutinação** é uma reacção mediada por ligação de anticorpos a antígenos, provocando aglutinação dos eritrócitos (Fig. 3). É o efeito mais comum quando nos referimos à determinação dos grupos sanguíneos. A aglutinação ocorre em duas etapas: 1) sensibilização, com a ligação do anticorpo ao antígeno na superfície da membrana do eritrócito; 2) formação de pontes entre os eritrócitos sensibilizados, que resulta na malha de aglutinação ⁽⁸⁾.

O principal efeito biológico das IgM é a activação do sistema de complemento a 37°C, que potencia o processo inflamatório e fagocítico, podendo provocar lise eritrocitária ^(3,8).

IgG

As IgG são produzidas na resposta imune secundária. Como tal, são considerados “anticorpos imunes”. Estruturalmente, são moléculas monoméricas, que tendem a combinar-se e a permanecer ligadas a antígenos da superfície dos eritrócitos, sendo possível detectar a sua presença em testes laboratoriais de antiglobulina directa. Este fenómeno designa-se **sensibilização** ⁽⁸⁾ (Fig. 3).

Por adquirirem capacidade hemolítica quando reactivas a 37°C, as IgG também são por vezes designadas de **hemolisinas** ⁽⁹⁾.

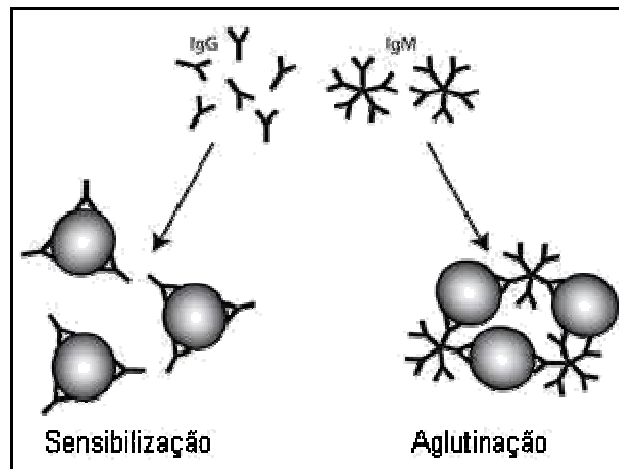


Fig. 3 – Esquema representativo dos fenómenos de Sensibilização e Aglutinação provocados por anticorpos da classe IgG e IgM, respectivamente. Adaptado de Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Imunologia Médica. 10th ed. Rio de Janeiro; 2004

Devido ao facto de as IgG's serem moléculas pequenas, possuem a capacidade de atravessar a placenta. Por esta razão, os recém-nascidos de mães do grupo O apresentam maior risco de Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), comparativamente com mães do grupo sanguíneo A e B ⁽⁸⁾.

Em contexto clínico, a ligação entre isoaglutininas e os respectivos antígenos, traduz-se em sequestro dos eritrócitos pelo sistema reticulo endotelial e reacção hemolítica de maior ou menor gravidade de acordo com a concentração (ou título) de isoaglutininas. Estas reacções hemolíticas são principalmente causadas pela actuação das isoaglutininas da classe IgG a 37°C ⁽⁸⁾.

1.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O sistema ABO é o sistema sanguíneo de maior importância clínica em Medicina Transfusional, porque a transfusão de componentes sanguíneos ABO incompatíveis conduz a reacções transfusionais hemolíticas que podem resultar em coagulação intravascular disseminada, falência renal e morte ⁽¹⁾. A importância clínica do sistema ABO é atribuída ao facto de os seus antígenos serem os mais imunogénicos de todos os grupos sanguíneos e de os seus anticorpos ocorrerem naturalmente, de serem universais, consistentes e presentes em todos os indivíduos que não possuem o antígeno correspondente. A causa mais comum de morte por transfusão é a incompatibilidade ABO por erro aleatório.

A transfusão de concentrados de eritrócitos deve ser isogrupal ou compatível no sistema ABO, ou seja, o grupo sanguíneo ABO do dador deverá ser igual ao grupo sanguíneo ABO do receptor ou compatível. No entanto, devido a questões logísticas relacionadas com a gestão de *stocks* de componentes sanguíneos, por vezes os Serviços de Imunohemoterapia não respeitam estas indicações.

Actualmente, encontram-se classificados dois tipos de incompatibilidade ABO ⁽¹⁾:

- **Incompatibilidade ABO *major***, na qual os anticorpos do receptor irão destruir os antígenos do dador (por exemplo, na transfusão de componentes A, B ou AB a receptores do grupo O)
- **Incompatibilidade ABO *minor***, na qual os anticorpos do dador poderão destruir os antígenos do receptor (por exemplo, na transfusão de componentes O a receptores do grupo sanguíneo A, B ou AB)

A transfusão ABO *major* incompatível de concentrados eritrocitários deve ser sempre evitada. Embora o risco hemolítico da incompatibilidade ABO *minor* possa ser minimizado se o dador não apresentar elevados níveis séricos de isoaglutininas, o recurso à transfusão ABO compatível deve ser respeitado. Podem ser visíveis sinais de hemólise eritrocitária após uma transfusão ABO *minor* incompatível, como resultado da destruição de alguns eritrócitos do receptor pela presença de anticorpos do sistema sanguíneo ABO no dador ⁽¹⁾.

De acordo com as normas do *AABB Standards for Blood Banks and Transfusion Services* ⁽⁸⁾, a selecção de componentes deverá ser feita com algum cuidado, como apresenta a tabela III:

Tabela II – Indicações para administração de componentes sanguíneos

Componente sanguíneo	Exigências em termos de grupo sanguíneo ABO
Sangue Total	Grupo do dador deve ser idêntico ao do receptor
Concentrado de Eritrócitos	Deve ser compatível com o plasma do receptor
Granulócitos (Aférese)	Deve ser compatível com o plasma do receptor
Plasma Fresco Congelado	Pode ser compatível com os eritrócitos do receptor
Plaquetas	Todos os grupos são aceites. No entanto, são preferíveis os componentes compatíveis com os eritrócitos do receptor

Existem algumas diferenças relativamente à transfusão de concentrados eritocitários e concentrados plaquetários. Pelo facto de os eritrócitos expressarem mais antígenos à superfície das suas membranas, comparativamente com as plaquetas, pode-se afirmar que a transfusão de eritrócitos apresenta um maior risco de hemólise, quando é necessário recorrer à transfusão de concentrados eritocitários ABO incompatíveis. O menor risco de hemólise associado à transfusão de plaquetas ABO incompatíveis deve-se à diluição dos anticorpos ABO no conteúdo plasmático dos receptores dos componentes plaquetários.

O anticorpo anti-A₁ não apresenta significado clínico se for reactivo apenas à temperatura ambiente. No entanto, estão relatadas na literatura algumas reacções transfusionais hemolíticas causadas por anti-A₁ a 37°C.

Tal como já foi referido anteriormente, as isoaglutininas anti-A, anti-B e anti-A,B da classe IgG são capazes de induzir Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), estando estes casos associados principalmente a bebés de mães do grupo sanguíneo O. Apesar da presença de isoaglutininas IgG no soro de mulheres do grupo O, os casos severos de DHRN são raros, por duas principais razões:

1. Os eritrócitos do recém-nascido apresentam baixa densidade de antígenos A e B;
2. As substâncias A e B solúveis que estão presentes no plasma fetal e noutros fluidos, podem neutralizar os anticorpos maternos ⁽¹⁾.

2. ANTIGÉNIOS PLAQUETÁRIOS

As plaquetas possuem expressão antigénica variável, o que vai condicionar a resposta transfusional e pode ser condicionante de reacções transfusionais ou de má resposta clínica à transfusão genericamente denominada de refractariedade plaquetária.

Para além de apresentarem antígenos plaquetários específicos (conhecidos como HPA), apresentam também, antígenos HLA e antígenos do sistema sanguíneo ABO na superfície da sua membrana, designados igualmente por antígenos ABH, tal como os eritrócitos ^(1,3,10). A maior parte dos determinantes antigénicos encontram-se localizados nas glicoproteínas implicadas nos fenómenos de adesão e agregação plaquetária ^(1,3).

2.1. EXPRESSÃO PLAQUETÁRIA DE ANTIGÉNIOS HPA

Os antígenos plaquetários específicos são designados por HPA. Até à data, estão referenciados 24 aloantígenos plaquetários específicos, dos quais 12 são agrupados em 6 sistemas bialélicos (HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15) ⁽¹⁰⁾, encontrando-se os restantes 12 ainda em classificação. Estes antígenos encontram-se nas glicoproteínas das membranas plaquetárias. Os dois síndromes clinicamente significativos, associados a estes antígenos são a Púrpura Trombocitopénica Neonatal Aloimune e a Púrpura Trombocitopénica Pós-transfusional ⁽³⁾.

2.2. EXPRESSÃO PLAQUETÁRIA DE ANTIGÉNIOS HLA

As plaquetas expressam antígenos HLA. Estes são responsáveis por fenómenos de aloimunização com consequente refractariedade plaquetária, caracterizada por um baixo incremento plaquetário após a transfusão de plaquetas. Cerca de 20% a 70% dos doentes politransfundidos revelam refractariedade plaquetária. Destes, cerca de um terço estão aloimunizados, principalmente por antígenos HLA classe I detectados por testes de linfotoxicidade ou por testes específicos para detecção de anticorpos anti-plaquetários ⁽³⁾.

Apesar da desleucocitação, a transfusão de plaquetas veicula leucócitos contaminantes (que expressam antígenos HLA da classe II) e células apresentadoras de antígenos, tais como a célula dendrítica, o macrófago e o monócito. Este sistema antigénico é o que apresenta maior polimorfismo e maior distribuição plurithecidual, sendo por isso o que coloca mais problemas de alo sensibilização, quando comparados com outros sistemas plaquetários e eritrocitários ⁽¹¹⁾.

2.3. EXPRESSÃO PLAQUETÁRIA DE ANTIGÉNIOS ABO (OU ABH)

Os antígenos plaquetários ABO (ou ABH) são detectáveis na membrana das plaquetas, sendo adquiridos por adsorção da sua forma solúvel plasmática ⁽³⁾, e encontram-se ligados covalentemente a várias glicoproteínas (GP) e glicolípidos endógenos membranares das plaquetas ⁽¹²⁾.

As glicoproteínas específicas das plaquetas que expressam os antígenos ABH incluem GPIIb/IIIa, GPIb/IIa, GPIc, GPIV, GPV, CD31 e CD109. As GPIIb/IIIa parecem contribuir activamente na expressão dos antígenos ABH das plaquetas ⁽¹³⁾.

A densidade de antígenos ABO à superfície das plaquetas varia de indivíduo para indivíduo, podendo influenciar em maior ou menor grau o resultado da transfusão de plaquetas, tal como os títulos variáveis de isoaglutininas existentes nos doentes politransfundidos condicionam o resultado da transfusão de eritrócitos ⁽¹¹⁾.

A origem dos antígenos ABH nas plaquetas tem sido estudada usando diversas abordagens. Dunstan e os seus colaboradores ⁽¹²⁾ utilizaram IgG monoclonais marcadas radioactivamente, mostrando que estes antígenos são uma mistura de componentes intrínsecos e extrínsecos das GP membranares plaquetárias.

Um estudo realizado em 1993 por Ogasawara e seus colaboradores ⁽¹⁴⁾, no qual foi quantificado o número de antígenos A e B expressos na superfície das plaquetas, por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), concluiu que a sua expressão não é homogénea, tendo os dadores sido classificados em grupos de “alta” e “baixa” expressão antigénica. Apenas 7% de todos os dadores estudados pertenciam ao grupo de “alta expressão”. Nenhum dador do grupo sanguíneo AB revelou expressão de antígenos A e B em simultâneo. Verificaram ainda que a expressão dos antígenos A e B estava relacionada com o nível de actividade das glicosiltransferases séricas.

Em outros estudos, verificou-se que a ligação de isoaglutininas anti-A da classe IgG foi detectada apenas em plaquetas de indivíduos do grupo sanguíneo A₁ ⁽¹⁵⁾. Esta observação permitiu explicar o facto de doentes refractários às plaquetas com elevados títulos de anti-A da classe IgG responderem com aumento do incremento plaquetário apenas a plaquetas de indivíduos classificados como A₂ ⁽¹⁶⁾.

3. TERAPÊUTICA TRANSFUSIONAL COM COMPONENTES PLAQUETÁRIOS

As plaquetas são vitais na manutenção da hemostase primária e apresentam-se sob a forma de pequenas células discóides de 2-3 µm de diâmetro. Facilitando a formação do trombo plaquetário, são fundamentais na prevenção e tratamento da hemorragia ⁽¹⁾.

O tratamento de doentes com patologia hemato-oncológica, doentes submetidos a transplante de Medula Óssea, o recurso a quimioterapia intensiva nos tumores sólidos, o tratamento de doentes politraumatizados ou a profilaxia hemorrágica pré-cirúrgica em doentes trombocitopénicos não seria possível sem recurso à transfusão de plaquetas ⁽¹⁷⁾.

A terapêutica transfusional com componentes plaquetários pode ter características profiláticas - transfusão de doentes com trombocitopenia normalmente causada por doença hematológica maligna ou induzida por quimioterapia - para prevenção de hemorragias, ou características terapêuticas quando é aplicada nas situações de hemorragia provocada por trombocitopenia. O seu uso deve ser optimizado para garantia da aplicação criteriosa de um produto de disponibilidade limitada ⁽¹⁷⁾.

A eficácia da terapêutica transfusional com plaquetas é dependente de múltiplos factores, não só relacionados com o receptor da transfusão, mas também com o tipo de componente transfundido.

3.1 COMPONENTES PLAQUETÁRIOS DISPONÍVEIS

As técnicas recentes de separação de componentes sanguíneos disponibilizam plaquetas sob a forma de Concentrados de Plaquetas obtidos a partir de sangue total (CP), Concentrados de Plaquetas obtidos por Aférese (CP-A) e Concentrados de Plaquetas obtidos a partir de Buffy-Coat (BCP) ⁽¹⁸⁾. Todos apresentam vantagens e desvantagens entre si, apresentadas na tabela III:

Tabela III – Vantagens e desvantagens dos 3 tipos de componentes plaquetários.

	Vantagens	Desvantagens
CP – Concentrado de Plaquetas obtido a partir de sangue total	Económico	Necessita de pool de 5 a 6 unidades para equivaler a um CP-A, aumentando o risco de aloimunização dos doentes Necessita de desleucocitação no momento do envio dos componentes
CP-A - Concentrado de Plaquetas (CP-A) obtido por Aférese	Obtido a partir de um único dador, reduzindo o risco de aloimunização nos doentes	Maior volume de plasma em suspensão, comparativamente com o CP Maior disponibilização de tempo do dador para a dádiva
BCP – Concentrado de Plaquetas obtido a partir de Buffy-Coat	Produto desleucocitado e pronto a usar	Processo moroso Necessita de <i>pool</i> de 4 unidades para equivaler a um CP-A, aumentando o risco de aloimunização dos doentes

Vários Serviços de Imunohemoterapia optam pela prática transfusional com CP-A, já que está confirmada a diminuição do doente à exposição a vários dadores, o que, por consequência, pode reduzir o risco de infecção associada à transfusão ^(17,19). Pensa-se ainda que um *pool* de CP's pode acarretar menor risco de hemólise eritrocitária. Pelo facto de conterem plasma de diferentes dadores, as isoaglutininas sofrem um efeito de diluição. Neste sentido, pode afirmar-se que os *pool* de CP apresentam menores títulos de isoaglutininas em suspensão ⁽²⁰⁾. No entanto, ainda não foi completamente demonstrado que a taxa de aloimunização pelo uso de CP-A seja significativamente menor, comparativamente com os CP ou BCP ⁽¹⁷⁾.

3.2 TRANSFUÇÃO DE PLAQUETAS INCOMPATÍVEIS NO SISTEMA ABO

O conceito de Transfusão de Plaquetas não isogrupais refere-se à infusão de componentes plaquetários que não respeitem o grupo sanguíneo do receptor, podendo dividir-se em dois grupos: ABO *major* e ABO *minor* ⁽²¹⁾.

3.2.1. INCOMPATIBILIDADE PLAQUETÁRIA ABO-MAJOR

A incompatibilidade plaquetária ABO-*major* refere-se a situações em que o receptor é exposto a antígenos plaquetários ABO do dador. São exemplos os casos de doentes do grupo sanguíneo O que são transfundidos com plaquetas de dadores do grupo sanguíneo A, B ou AB. Nestes casos, as isoaglutininas circulantes do receptor ligam-se aos respectivos antígenos plaquetários do dador, formando imunocomplexos, que são posteriormente destruídos. Por esta razão, este tipo de incompatibilidade pode conduzir a uma diminuição da resposta plaquetária devido à destruição acelerada das plaquetas do dador. De acordo com uma revisão bibliográfica realizada em 2010 por Cassandra Josephson ⁽²¹⁾, esta investigadora refere que a transfusão repetitiva de componentes sanguíneos com plasma incompatível é acompanhada pelo aumento do título de anti-A e anti-B que, consequentemente, irão encurtar a sobrevivência das plaquetas incompatíveis após a transfusão.

3.2.2. INCOMPATIBILIDADE PLAQUETÁRIA ABO-MINOR

A incompatibilidade plaquetária ABO-*minor* refere-se a situações em que o receptor é exposto a anticorpos séricos ABO do dador. São exemplos os casos de doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB que são transfundidos com plaquetas de dadores do grupo sanguíneo O. Este tipo de incompatibilidade pode conduzir a hemólise eritrocitária do receptor ^(20,21), dado que as isoaglutininas circulantes (principalmente anticorpos naturais como anti-A e anti-B) do dador podem reagir com os antígenos existentes na superfície dos eritrócitos do receptor. A este processo dá-se o nome de Transferência Passiva.

O risco de uma reacção hemolítica após transfusão de componentes plaquetários com incompatibilidade *minor* é um evento muito raro e quando acontece, está normalmente associado à infusão de grandes volumes de plasma incompatível – com isoaglutininas incompatíveis com os antígenos ABO do receptor. Na realidade, quando plasma incompatível é transfundido, ele é rapidamente diluído na volémia do doente e as substâncias A ou B solúveis neutralizam os anticorpos anti-A ou anti-B infundidos, o que minoriza a eventual reacção. No entanto, se a transfusão contiver um grande volume de plasma a neutralização pode não ocorrer por saturação, o que vai permitir que as isoaglutininas se liguem aos respectivos antígenos eritrocitários e induzam hemólise.

4. TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS

O conceito de Transferência Passiva, também conhecido como Imunização Passiva, aplica-se normalmente à aquisição de anticorpos por gravidez, injeção de imunoglobulinas (por exemplo, com a vacinação), por transfusão com componentes sanguíneos (nomeadamente derivados de plasma) ou por transplante de órgãos ou de células progenitoras hematopoiéticas⁽⁸⁾.

Após a detecção de um anticorpo, a sua especificidade pode ser determinada e o seu significado clínico pode ser avaliado. Um anticorpo clinicamente significativo está definido como um anticorpo que está frequentemente associado a doença hemolítica do feto ou do recém-nascido, a reacções transfusionais hemolíticas ou a um notável decréscimo da sobrevivência dos eritrócitos transfundidos.

O significado clínico da transferência passiva de anticorpos é variável, dependendo, entre outras, da expressão antigénica associada, das características das imunoglobulinas e da reactividade do hospedeiro.

O risco de hemólise eritrocitária por transferência passiva de isoaglutininas pode variar entre 1:6600 e 1:9000 se forem utilizados CP-A com plasma incompatível⁽²²⁾. O factor mais importante para avaliar se poderá ocorrer hemólise após transfusão com componentes plaquetários ABO incompatíveis consiste na determinação da quantidade de anticorpo transfundido. Esta quantidade é dependente do grupo sanguíneo do dador. Sabe-se que os indivíduos do grupo O apresentam, em média, concentrações mais elevadas de isoaglutininas, comparativamente com os indivíduos dos grupos A e B⁽²⁰⁾.

A transferência passiva de isoaglutininas dirigidas aos antígenos A e/ou B dos eritrócitos do receptor (incompatibilidade ABO *minor*) só ocasionalmente desencadeia consequências graves após a transfusão. Quando o plasma do dador é infundido, os anticorpos são rapidamente diluídos no plasma do receptor. Desta forma, o número de moléculas de anticorpos IgG que revestem os eritrócitos do receptor irá ser reduzido, pelo que o seu reconhecimento pelos macrófagos irá ser dificultado. Pode então concluir-se que o risco de reacções adversas nos receptores após transfusão de componentes sanguíneos derivados de plasma não isogrupais é mínimo⁽²³⁾.

5. REACÇÕES TRANSFUSIONAIS ASSOCIADAS A TRANSFUSÃO DE COMPONENTES PLAQUETÁRIOS ABO *MINOR* INCOMPATÍVEIS

As reacções transfusionais hemolíticas agudas (RTHA) são as principais reacções associadas à transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis ^(20,24), devido à infusão de anticorpos da classe IgG no receptor. Os sinais e sintomas destas reacções incluem tremores, dispneia, hemólise severa, hemoglobinúria, hemoglobinemia, hipotensão, choque e, em alguns casos mais severos, coagulação intravascular disseminada, falência renal aguda e morte.

Laboratorialmente, este tipo de reacções pode ser detectado por testes serológicos, como o Teste de Antiglobulina Directo (TAD). Embora não seja específico, é possível suspeitar de hemólise perante um resultado positivo no TAD. ^(21,23,25).

O risco de desenvolvimento de RTHA após transfusão de plaquetas ABO incompatíveis é desconhecido, embora um estudo de Josephson e seus colaboradores ⁽²¹⁾ tenha apontado para um número de casos variável entre 1:2000 e 1:46176 transfusões de plaquetas. No entanto, o risco pode aumentar se forem administrados CP-A, que contêm 4 a 8 vezes mais plasma que um Concentrado Plaquetário isolado ⁽²¹⁾.

De acordo com um estudo realizado por Sazama ^(25,26), entre 1976 e 1985 foram relatadas, nos Estados Unidos, 158 mortes (n=355) relacionadas com hemólise aguda após administração de transfusões. Destas 158 mortes, 131 resultaram de incompatibilidade ABO. Verificou-se ainda que 26 mortes foram atribuídas a hemólise retardada, embora a pesquisa e análise dos anticorpos envolvidos não tenha sido totalmente conclusiva.

Um outro estudo realizado em 2009, por Shanwell e colaboradores ⁽²⁷⁾ revelou que doentes submetidos a transfusão de componentes plaquetários ABO incompatíveis apresentavam um índice médio de sobrevida de 14 dias após a transfusão. Neste estudo concluiu-se ainda que a percentagem de mortalidade aumenta de acordo com o maior número de transfusões de componentes plaquetários ABO incompatíveis.

De forma a evitar RTHA, existem *Guidelines* transfusionais que recomendam a redução de volume em casos de transfusão ABO *minor* de componentes plaquetários, principalmente se administrados em crianças ou recém-nascidos. No entanto, esta redução de volume deverá ser realizada sob parâmetros específicos de centrifugação para minimizar a activação e destruição plaquetária ⁽²¹⁾.

6. ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO RISCO DE REACÇÕES TRANSFUSIONAIS HEMOLÍTICAS CAUSADAS POR ANTICORPOS ABO EM DERIVADOS DE PLASMA

Apesar de serem reconhecidas vantagens significativas na transfusão de plaquetas idênticas no sistema ABO, condicionantes relacionadas com o inventário dos componentes plaquetários dos diferentes grupos não permitem que os serviços sigam de uma forma universal esta recomendação. A disponibilidade de plaquetas ABO compatíveis e o desperdício de plaquetas não compatíveis pelo limite de validade, associado ao facto de se tratar de um produto terapêutico de origem biológica e, portanto, de disponibilidade limitada, obriga a critérios de utilização alargados. Isto não implica que não sejam estabelecidas políticas que minimizem o risco de exposição dos doentes a plasma incompatível.

As estratégias para redução da transferência passiva de isoaglutininas incompatíveis são de eficácia variada e não estão estabelecidas normas consensuais que facilitem a adopção de medidas por parte dos serviços que se revelem eficazes.

A utilização crescente de plaquetas de dador único (CP-A) pode aumentar a gravidade das reacções hemolíticas porque a dose de plasma incompatível infundido é superior à transfundida quando se recorre a *pools* de plaquetas de vários dadores.

Num artigo de revisão bibliográfica realizado por Cristoph Buchta em 2004 ⁽²³⁾, o autor sugere a utilização de dadores do grupo sanguíneo AB, dada a inexistência de isoaglutininas nestes indivíduos. No entanto, devido à sua frequência na população ser de apenas 3%, esta prática nem sempre é viável. Ainda neste artigo, é referida a possibilidade de excluir “dadores perigosos”. Antes de o plasma de dadores com alto título de anti-A e anti-B ser utilizado para produção de CP-A ou *pools* de CP, é recomendada a titulação de isoaglutininas em todos os dadores, de forma a excluir os de alto título, da produção de derivados de plasma.

A redução de isoaglutininas incompatíveis no componente transfundido pode ser conseguida através da redução de volume. Normalmente esta prática está reservada ao doente pediátrico quando não há alternativa com produtos compatíveis. O procedimento tem várias desvantagens: 1) é demorado, o que não permite dar resposta a situações urgentes; 2) o procedimento tem de ser feito em sistema fechado; 3) há risco de activação plaquetária e de diminuição do rendimento plaquetário com consequente diminuição da eficácia.

Para os componentes obtidos por aférese, é possível utilizar uma solução aditiva plaquetária substituindo-se assim parte do volume de plasma incompatível minimizando significativamente a transferência de isoaglutininas incompatíveis. No entanto, nem todos os centros utilizam este tipo de soluções por estar associada a alguma diminuição de rentabilidade e também não é

conhecido qual o menor volume de plasma incompatível nas situações em que os dadores possuem alto título de isoaglutininas, para que seja possível prevenir hemólise aguda.

Limitar a exposição diária do doente a plasma ABO incompatível transfundido durante a terapêutica com componentes plaquetários é também uma recomendação que surge com frequência na literatura científica ^(21,23). Permite que o nível de isoaglutininas não vá aumentando no receptor motivado por exposição frequente a plasma incompatível, mas não previne a reacção aguda nas situações em que mesmo numa única transfusão o dador apresente alto título de isoaglutininas

Por último, uma das estratégias que já se tornou recomendação consiste em utilizar plaquetas do grupo O para doentes grupo A, B ou AB apenas quando os dadores tiverem sido testados para alto título de Anti-A ou anti-B e considerados como sendo de baixo título. No entanto não foi até ao momento definido nenhum teste que, com exactidão, permita estabelecer o *cut-off* entre o baixo e o alto título de isoaglutininas, nem está recomendado em especial nenhum teste laboratorial de titulação. Apesar de a *European Pharmacopoeia* recomendar a utilização de *pools* de CP ou BCP com título de isoaglutininas inferior a 64, a possibilidade de ocorrência de reacções adversas graves não está plenamente excluída. Para além desta indicação, há outros estudos que consideram valores de *cut-off* de 100 e de 256, permanecendo a dúvida quanto ao título crítico de isoaglutininas.

7. MÉTODOS LABORATORIAIS EM IMUNOHEMATOLOGIA

A Imuno-hematologia eritrocitária é uma área essencialmente laboratorial que tem como objectivo garantir a segurança imunológica da transfusão. Como tal, abrange o estudo laboratorial no contexto clínico da imunologia do eritrócito (da interacção dos eritrócitos com o sistema imunitário).

A área de Imunohematologia tem vindo a desenvolver-se desde a descoberta dos grupos sanguíneos. Os primeiros estudos imunohematológicos eram realizados pela metodologia em tubo, na qual ocorria a adição de soros e células em tubos de propileno. Actualmente, esta metodologia mantém-se como metodologia de referência, embora seja utilizada principalmente na execução de testes imunohematológicos rápidos. Devido à sua baixa sensibilidade e especificidade, novos métodos foram sendo desenvolvidos no sentido de aumentar estes indicadores ⁽⁸⁾. Actualmente, várias casas comerciais disponibilizam reagentes com características monoespecíficas e poliespecíficas, baseando-se na metodologia em tubo. Assim, é possível realizar estudos imunohematológicos de hemaglutinação em microplaca, em fase sólida, em gel, em esferas de vidro, entre outras. Existem ainda técnicas de Biologia Molecular, que são desenvolvidas em casos de necessidade de aumento na especificidade e sensibilidade da resposta.

7.1 PROVA CELULAR, PROVA DIRECTA OU PROVA GLOBULAR

A pesquisa e identificação laboratorial de antígenos eritrocitários do sistema ABO é possível com base em mecanismos de hemaglutinação, caracterizado pela ligação do anticorpo ao respectivo antígeno, método a que comumente se dá o nome de prova celular, prova directa ou prova globular. Actualmente, várias casas comerciais dispõem de reagentes monoclonais e de origem humana constituídos por anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B, aos quais são adicionadas suspensões de eritrócitos das amostras a testar. Dependendo da casa comercial, a metodologia utilizada pode ser a hemaglutinação em gel, em tubo ou em microplaca. Os eritrócitos de indivíduos classificados como A reagem fortemente com o reagente anti-A, os B reagem fortemente com anti-B, os O não deverão apresentar reacção com nenhum reagente, enquanto os indivíduos AB deverão reagir com os reagentes anti-A, anti-B e anti-A,B ⁽⁸⁾.

Os eritrócitos de indivíduos classificados como A₁ e A₂ reagem fortemente com o reagente anti-A nos testes de hemaglutinação. Cerca de 80% dos indivíduos do grupo A ou AB possuem eritrócitos que aglutinam com anti-A₁, sendo classificados como A₁ ou A₁B. Os restantes 20% apresentam eritrócitos que aglutinam com anti-A mas não com anti-A₁, sendo classificados de A₂ ou A₂B ⁽⁶⁾. Destes, 1% a 8% dos indivíduos classificados como A₂ e 25% dos indivíduos classificados como A₂B possuem anti-A₁ no seu soro ^(1,3). Ambos os fenótipos A₁ e A₂ possuem o antígeno A, mas as células A₁ apresentam este antígeno A₁ adicional, que está ausente nas células A₂ ⁽¹⁾.

7.2 PROVA REVERSA OU PROVA SÉRICA

A prova reversa, também denominada prova sérica, consiste num teste imunohematológico *in vitro* que permite a pesquisa de isoaglutininas anti-A e anti-B em circulação nos indivíduos. O soro/plasma das amostras é testado contra uma suspensão de eritrócitos de antigenicidade específica conhecida, classificados como A₁, A₂ e B. Após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e subsequente centrifugação, os resultados são interpretados ⁽⁸⁾.

7.3 TITULAÇÃO DE ISOAGLUTININAS

A titulação de isoaglutininas permite a quantificação de anti-A e anti-B em circulação nos indivíduos. Apesar de não ser ainda um procedimento padronizado nem se encontrar integrado na rotina laboratorial da maioria dos serviços de Imunohemoterapia, pode revelar-se importante quando é necessário estudar causas de reacções pós-transfusionais. De salientar que a presença de outros anticorpos não pertencentes ao sistema sanguíneo ABO pode influenciar o resultado da titulação de isoaglutininas. Por esta razão, a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) deve ser negativa.

A nível laboratorial, a distinção entre imunoglobulinas IgM e IgG pode ser baseada em reagentes monoespecíficos ou através de um pré-tratamento da amostra com Dithiothreitol (DTT), que cliva as ligações dissulfídicas das IgM pentaméricas, abolindo a sua capacidade aglutinante e de activação do complemento, permitindo assim a detecção de anticorpos IgG séricos ^(9,28,29). Embora vantajoso neste ponto, o tratamento com DTT apresenta a desvantagem de ser um teste manual e moroso, que implica várias fases de incubação e tratamento das amostras.

Outra forma de distinguir laboratorialmente IgG e IgM, consiste na utilização dos reagentes adequados. Sabe-se que as IgM aglutinam eficazmente os eritrócitos em meio salino, enquanto as IgG necessitam do recurso a reagentes potenciadores das reacções (tais como a antiglobulina humana e soluções de baixa força iónica) para produzir aglutinação ^(1, 8). Actualmente, as casas comerciais disponibilizam estes tipos de reagentes, prontos a usar.

A temperatura é um dos factores que afectam a aglutinação eritrocitária. Em geral, os anticorpos IgM são mais reactivos a baixas temperaturas (4-27°C), enquanto os anticorpos IgG são mais reactivos a 37°C. Os anticorpos que reagem *in vitro* apenas a temperaturas abaixo dos 37°C raramente causam destruição dos eritrócitos transfundidos e não são considerados como clinicamente significativos. Os anticorpos clinicamente significativos caracterizam-se pela diminuição da sobrevivência dos eritrócitos. Esta condição pode ser detectada por reactividade *in vitro* a 37°C ^(1,8).

Sabe-se que as isoaglutininas da classe IgG podem ser responsáveis por reacções transfusionais hemolíticas agudas, se forem reactivas a 37°C. Por este facto, vários estudos têm sido realizados com o objectivo de tentar definir o conceito de “alto” ou “baixo” título de isoaglutininas. O ponto de partida tem sido verificar a partir de que valor de título de isoaglutininas ocorrem reacções transfusionais hemolíticas e avaliar esta resposta com base em Testes de Antiglobulina Directos. Alguns estudos consideram valores iguais ou superiores a 256 ⁽³⁰⁻³²⁾ como valor crítico, enquanto outros consideram que esse título crítico será para valores iguais ou superiores a 100 ^(33,34). Um terceiro tipo de estudos foi desenvolvido com o objectivo de verificar se existiam diferenças no título de isoaglutininas entre diferentes tipos de componentes plaquetários ⁽³⁵⁾.

De acordo com uma revisão bibliográfica ⁽³⁰⁾ realizada em 2002 pelo *National Blood Service (NBS) Transfusion Medicine Clinical Policies Group*, que reúne casos de transfusão de componentes plaquetários não isogrupais realizados em vários hospitais, concluiu-se que, em 13 casos reportados de hemólise significativa atribuída a altos títulos de anti-A e anti-B, todos excediam o valor 256. Destes 13 casos, 1 revelou-se fatal.

Em 2003, um grupo de investigadores indianos ⁽⁹⁾ testou 187 amostras de dadores do grupo O para hemolisinas IgG. Para distinguir IgG de IgM, trataram 35 das 187 amostras com DTT. Foram detectadas altas frequências de hemolisinas nas amostras testadas (62,8% apresentavam títulos ≥ 64). Neste estudo, é ainda referido que populações asiáticas e africanas apresentam títulos de hemolisinas mais elevados, comparativamente com populações caucasianas, sugerindo-se que a diferença pode dever-se a picadas de insectos que transmitem infecções parasitárias intestinais.

Em 2004, um outro grupo de investigadores ⁽³⁴⁾ do Hemocentro de Botucatu (Brasil) realizou um estudo, considerando valores superiores a 100 como “alto título”. Neste estudo, 600 dadores de CP-A do grupo O foram estudados com base na metodologia de hemaglutinação em microplaca. 12,8% dos dadores foram considerados “perigosos”. Destes, 58,4% apresentava altos títulos de anti-A, 14,2% de anti-B e 27,2% de anti-A e anti-B.

Nesse mesmo ano, Cassandra Josephson ⁽³¹⁾ e colaboradores determinaram o título de 100 CP-A do grupo O, com base na metodologia em gel. Concluíram que existe um número significativo (30-40%) de dadores de CP-A do grupo O com altos títulos de anti-A e anti-B, baseando o título crítico em valores de isoaglutininas ≥ 256 .

Em 2007, a equipa do Serviço de Hemoterapia do Hospital do Servidor Público Estadual Francisco Morato de Oliveira (Brasil) realizou um estudo para determinar o título de isoaglutininas anti-A e anti-B em 285 dadores de CP-A do grupo O (pela metodologia em tubo) e determinar o nível crítico seguro para transfusões ⁽³²⁾. Foram detectados 22,8% de dadores com alto título (≥ 256) de anti-A e 17,9% com alto título de anti-B. Não foram relatadas reacções transfusionais hemolíticas agudas (RTHA) após transfusão de CP-A do grupo O em receptores A e B após adopção do título seguro < 128 , pelo que este foi o valor assumido como valor de *cut-off* crítico.

Em 2008, um grupo de investigadores do centro de Hematologia e Hemoterapia de Guarapuava determinou o título de isoaglutininas de 564 dadores do grupo sanguíneo O, pela metodologia em microplaca ⁽³³⁾. Com base no valor crítico de 100, detectaram 92,7% de dadores de baixo título (≤ 100) e 7,3% de dadores de alto título (≥ 100), sendo estes últimos considerados “perigosos”. Dos dadores de alto título, 44,4% foram reactivos para anti-A₁, 35,6% para anti-B e 20% para anti-A e anti-B.

Com o objectivo de comparar títulos de isoaglutininas entre diferentes tipos de componentes plaquetários, um grupo de investigadores dos Hospitais da Universidade de Michigan, conduzido por Laura Cooling ⁽³⁵⁾ avaliou os títulos de anti-A e anti-B em CP-A e *pools* de CP do grupo O, pelas metodologias em tubo e em gel. Concluíram que os títulos de anti-A e anti-B

não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre *pools* de CP e CP-A. No entanto, verificaram que os títulos determinados pela metodologia em Gel eram superiores aos títulos determinados pela metodologia em tubo.

De todos estes estudos, não foi possível concluir qual o título crítico de isoaglutininas seguro para evitar transfusões de plaquetas ABO incompatíveis de alto risco hemolítico.

7.4 TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRECTO

O TAD, também designado de teste de Coombs, Coombs directa ou prova de antiglobulina directa, é um teste que permite evidenciar anticorpos adsorvidos *in vivo* aos antígenos eritrocitários, possibilitando avaliar a presença e desenvolvimento de auto e alo-anticorpos ⁽⁸⁾.

A nível laboratorial, este teste deverá ser realizado em meio de Antiglobulina Humana (AGH) poliespecífica, capaz de detectar a presença de IgG e/ou C3d ⁽⁸⁾. A Fig. 4 representa o mecanismo de funcionamento deste teste.

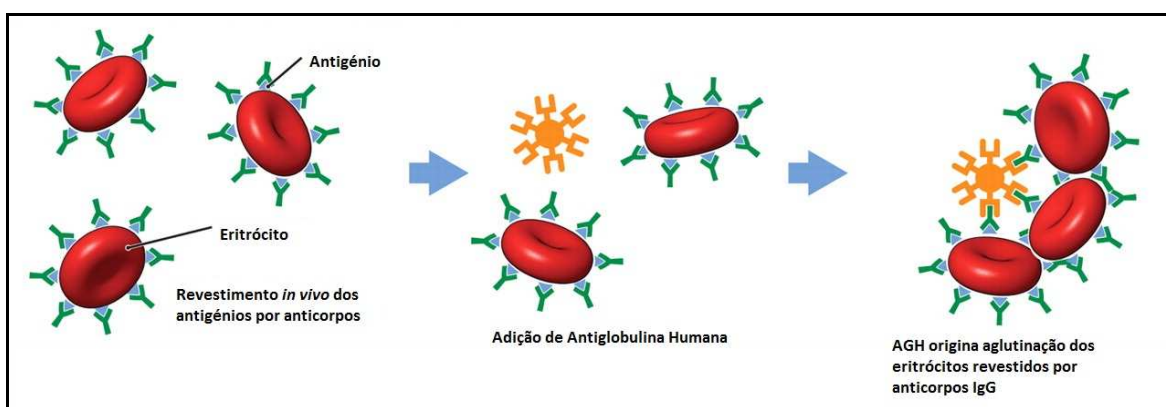


Fig. 4 – Esquema representativo do mecanismo de funcionamento do Teste de Antiglobulina Directo (TAD). Adaptado de EMCrit.org

A transição de um TAD negativo anterior à transfusão de CP incompatíveis no sistema ABO para um TAD Positivo após a transfusão pode ser indicativo da presença de um alto título de isoaglutininas em suspensão no componente plaquetário. Por esta razão, torna-se necessário proceder à sua determinação.

A transfusão de plaquetas incompatíveis no sistema sanguíneo ABO pode ser uma causa de positividade nos resultados do TAD, dado que as isoaglutininas do dador presentes nos concentrados de plaquetas podem ligar-se aos antígenos eritrocitários do receptor. No entanto, este não é um teste de diagnóstico só por si. A interpretação de um resultado positivo depende de alguns factores do doente, tais como medicação recente, histórico de gravidez e histórico transfusional. Por vezes, fenómenos de hemólise estão também associados a resultados de TAD positivos. Um pequeno estudo realizado na Universidade do Texas ⁽³⁶⁾ em 2006, revelou que 82% dos doentes transfundidos com plaquetas ABO incompatíveis desenvolveram TAD positivo, enquanto os restantes não apresentaram estes resultados. Neste estudo, os investigadores tentaram investigar qual a relação entre um TAD positivo após transfusão de plaquetas ABO incompatíveis e a hemólise. Concluíram que não era possível relacionar estas duas variáveis, ou seja, um TAD positivo não significa que ocorra sempre hemólise com significado clínico. No entanto, mostrou que a transfusão ABO incompatível pode induzir hemólise mediada por imunização ⁽³⁶⁾.

7.5 ELUADO ERITROCITÁRIO

O princípio do teste do Eluado Eritrocitário consiste na remoção de anticorpos adsorvidos pelos eritrócitos sensibilizados para facilitar a sua identificação. Este teste é útil na investigação de TAD Positivos associados a hemólise intravascular provocada por anticorpos IgG, no estudo de reacções transfusionais e na investigação de Doença Hemolítica do Recém-Nascido ⁽⁸⁾. Há várias metodologias de eluição, sendo as mais frequentemente utilizadas a eluição pelo calor, pelo éter ou a eluição ácida ⁽⁸⁾. Esta última foi a metodologia seleccionada para os casos estudados neste trabalho, pela existência de um kit comercial da Immucor Gamma®, o Elu-kit II®.

Na eluição ácida, os eritrócitos revestidos com anticorpos são inicialmente lavados com uma solução de lavagem específica para remoção dos anticorpos não ligados, mantendo-se a associação antígeno-anticorpo. Os eritrócitos lavados são depois suspensos numa solução de glicina com pH ácido, para dissociação dos anticorpos adsorvidos. Após centrifugação, o sobrenadante é separado dos eritrócitos e neutralizado pela adição de uma solução alcalina (*buffer solution*). O eluado está neste momento disponível para se proceder à identificação do(s) anticorpo(s) presente(s), que pode ser executada por um Teste de Antiglobulina Indirecto. Após casos de transfusões ABO *minor* incompatíveis, o receptor pode apresentar hemólise. Nestes casos, o eluado deve ser testado contra células com os antígenos A₁ e/ou B.

8. ANÁLISE DA LITERATURA

O presente trabalho baseou a sua fundamentação teórica num grupo de estudos realizados por outras organizações, e que foram sendo mencionados até este momento.

Enquanto uns investigadores procuraram determinar o título de isoaglutininas em grupos de dadores de outras populações, ^(30,32-34) outros investigadores compraram o título de isoaglutininas entre diferentes componentes plaquetários, nomeadamente CP-A e *pool* de CP ^(31,35).

Numa outra abordagem, foram consultados artigos de revisão bibliográfica, onde são referidos os conceitos aplicados neste trabalho, e onde são documentados relatos de reacções transfusionais associadas a transfusões de componentes sanguíneos ABO incompatíveis, mais especificamente transfusões ABO *minor* incompatíveis, relacionando-os com os títulos de isoaglutininas anti-A e anti-B desses mesmos componentes ^(21,22,27,30). As tabelas IV e V apresentam alguns dos casos relatados nesses artigos.

Tabela IV– Relatos de reacções transfusionais numa revisão bibliográfica de 2002 (adaptado de National Blood Service Transfusion Medicine Clinical Policies Group)

Ano de Publicação	Grupo sanguíneo doente	Grupo sanguíneo dador	Anticorpo implicado	Componente transfundido	Reacção	Título de anti-A e/ou anti-B	Idade do receptor
1966	A	O	Anti-A	Sangue total do grupo O	Hemolítica severa. Falência renal	128	4 anos
1977	AB	O	Anti-A ₁	<i>pool</i> de CP com 10 unidades	Hemolítica severa. Hemoglobina livre no soro e bilirrubinemia	256	44 anos
1978	A	O	Anti-A	Sangue total	Hemolítica com hemoglobulinemia e hemoglobinúria	8192	31 anos
1982	A	O	Anti-A	2 <i>pool</i> de CP	Hemólise significativa (Hemoglobina (Hb) diminuiu de 14 para 8 g/dL)	10240	45 anos
1984	A	O	Anti-A	Plaquetas de Aférese	Hemólise. Coagulação Intravascular Disseminada (CID)	8192	15 anos

Transferência Passiva de isoaglutininas em transfusão de plaquetas ABO Minor incompatíveis

1985	A	O	Anti-A	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa, CID e morte	32000	2,5 anos
1985	B	O	Anti-B	pool de 1 CP do grupo O + 5 CP do grupo B	Hb diminuiu de 11,5 para 5,7 g/dL, sem hemoglobulinemia. Sem reacção aguda	256	58 anos
1988	A	O	Anti-A	1 pool de CP	Hemólise aguda. Hemoglobinúria. Hb diminuiu 2,6 g/dL em 5 horas	>4000	66 anos
1989	B	O	Anti-B	Plaquetas de Aférese	Hemólise. Hb diminuiu de 11,3 para 5,2 g/dL	4096	56 anos
1990	A	O	Anti-A	Plaquetas HLA-compatíveis	Hemólise severa (Hb diminuiu de 11,4 para 6 g/dL). Falência renal aguda	1024	30 anos
1995	B	O	Anti-B	Plaquetas do grupo AB contaminadas com eritrócitos do grupo O	Hemólise severa, febre, hemoglobinúria	>64000	6 dias
1996	A	O	Anti-A	Plaquetas	Criança em cirurgia cardíaca. Sem reacção aguda. Hb diminuiu de 13,6 para 9,1 g/dL em 48 horas	3200	5 semanas
1998	A	O	Anti-A	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa. Hb diminuiu de 8,4 para 5,8 g/dL em 24 horas	128 (salino)	28 anos

Nesta revisão bibliográfica realizada em 2002 ⁽³⁰⁾ com base em casos documentados em 32 anos, encontram-se relatados 13 casos de reacções transfusionais de gravidade variável. Observando a tabela, não é possível estabelecer uma relação directa entre o título de isoaglutininas presentes nos componentes sanguíneos e a intensidade das reacções transfusionais. No entanto, é possível verificar que os casos de crianças parecem apontar para

reações transfusionais de maior gravidade, comparativamente com as reacções relatadas em adultos.

Os casos relatados na tabela V referem-se a transfusão de componentes plaquetários ABO *minor* incompatíveis, de acordo com uma revisão bibliográfica efectuada em 2007 por Mark K. e seus colaboradores ⁽²¹⁾.

Tabela V - Relatos de reacções transfusionais numa revisão bibliográfica de 2007 (adaptado de Fung M. Transfusion of Platelets containing ABO-Incompatible Plasma); Hb – hemoglobina; CP- Concentrado de Plaquetas obtido a partir de sangue total; CP-A – Concentrado plaquetário colhido por Aférese.

Ano de Publicação	Grupo sanguíneo doente	Grupo sanguíneo dador	Componente transfundido	Reacção	Título de anti-A e/ou anti-B	Idade do doente
1975	A ₂ B	O	pool de 4 CP	Hemólise severa com perda de Hb de 1 g/dL por dia	128	40 anos
1977	A _{int} B	O	pool de 10 CP	Sem reacção até o doente ter sido transfundido com 20mL de CE. Nesse momento, desenvolveu febre, tremores e hemoglobinemia	256 (anti-A) 64 (anti-B)	44 anos
1982	A	O	2 CP-A	Hemólise significativa. Hb diminuiu de 14 para 8 g/dL	10.240 (ambos os dadores)	45 anos
1982	A	O	4 CP	Hemólise aguda com hemoglobinemia, hemoglobinuria e tremores. Hematócrito diminuiu de 0,22 para 0,16	8192 Hemólise grave com células A2 da prova reversa	20 anos
1984	A	O	200 mL de Plaquetas de Aférese	Hemólise severa com CID e falência renal	8192 (salino)	15 anos
1985	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa com CID e morte. Hb diminuiu de 11,5 para 5,7 g/dL	32.000	2,5 anos
1985	B	O	1 CP-A	Sem reacção aguda. Hb diminuiu de 14,3 para 8,2 g/dL em 7 dias	16.384	58 anos

Transferência Passiva de isoaglutininas em transfusão de plaquetas ABO Minor incompatíveis

1988	A	O	1 CP-A	Hemólise aguda com hemoglobinemia e hemoglobinúria. Hb diminuiu 2,5 g/dL em 5 horas	>4.000	66 anos
1989	B	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa. Hb diminuiu de 11,3 para 5,2 g/dL	4096 (anti-B)	56 anos
1990	A	O	2 CP-A HLA compatíveis do mesmo dador (255mL transfundido inicialmente; 448 mL transfundido 25 dias depois)	Primeira transfusão: sem reacção aguda; Segunda transfusão: hemólise severa, Hb diminuiu de 11,4 para 6,0 g/dL, com falência renal; os efeitos foram atribuídos ao maior volume de plasma	Primeira dádiva: 2048 Segunda dádiva: 1024	30 anos
1991	AB	O	Plaquetas de Aférese e pool de plaquetas, perfazendo um volume de plasma de 1,2L	Hemólise progressiva. Hb diminuiu aproximadamente 5 g/dL	1024 (salino)	18 anos
1998	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa. Hb diminuiu de 8,4 para 5,8 g/dL em 24 horas	128 (salino)	28 anos
1999	AB	O	Plaquetas de Aférese	Tremores, dispneia e hemoglobinúria	Não foi testado	72 anos
2000	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise intravascular e resultado positivo no TAD	>20.000	36 anos
2000	A	O	Plaquetas de Aférese	Dor de costas, hemoglobinúria e hemoglobinemia	16.384 (salino)	44 anos
2000	A	O	2 frações do mesmo CP-A para 2 doentes	Primeiro doente: hipotensão e choque	>8.000 (com hemólise à temperatura ambiente)	51 anos
				Segundo doente: hipotensão e hemólise. Recurso a hemodiálise. Morte.	128 (a 37°C; metodologia não descrita)	16 anos
2002	A	O	pool de plaquetas	Reacção transfusional hemolítica com subseqüentes complicações nas provas de compatibilidade	Não foi testado	Não foi relatado

Transferência Passiva de isoaglutininas em transfusão de plaquetas ABO Minor incompatíveis

2004	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise significativa (bilirrubina elevada, diminuição da hemoglobina e decréscimo da função renal)	>8.192	31 anos
2004	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemoglobinemia, hemoglobinúria, <i>rigor</i> e dor de costas	256 (IgM) 8.192 (IgG)	Não foi relatado
					1024 (IgG) 32 (salino)	Não foi relatado
2004	A	O	Plaquetas de Aférese	Dor de costas aguda. Decréscimo de Hb.	32 (salino)	Não foi relatado
2005	A	O	Plaquetas de Aférese (145 mL)	Choque e hemólise intravascular marcada, com diminuição de Hb de pelo menos 4 g/dL	2048 (salino) 16.384 (IgG)	2 anos
2005	A	O	Plaquetas de Aférese	Hemólise severa	512 (salino)	Não foi relatado
2005	AB	O	Plaquetas de Aférese	Reacção hemolítica severa	Não foi testado	Não foi relatado
2005	A	O	<i>pool</i> de 7 CP	Hb livre no plasma de 316 g/L	<20	3 meses

Nesta revisão bibliográfica mais recente, que reúne casos de reacções transfusionais em 30 anos, não foi possível estabelecer uma relação directa entre os títulos de isoaglutininas e as reacções transfusionais ocorridas.

No entanto, ambas as tabelas apresentam resultados que parecem apontar para um maior número de casos de reacções transfusionais em crianças, talvez devido à proporção entre o volume plasmático dos componentes plaquetários e a volémia da criança.

PARTE II: ESTUDO EMPÍRICO

OBJECTIVOS

O objectivo deste estudo consistiu em determinar o título de isoaglutininas IgG anti-A₁ e anti-B em dadores de componentes plaquetários por aférese, do grupo O, e tentar estabelecer a partir de que título é possível afirmar que a transferência passiva de isoaglutininas incompatíveis com o receptor adquire significado clínico e de que forma se associa a uma diminuição dos valores de hemoglobina ou desenvolvimento de resultados positivos na prova de antiglobulina directa. Esta transferência pode estar relacionada com a ligação das isoaglutininas do dador aos antígenos do receptor. Utilizando a técnica estabelecida no serviço de Medicina Transfusional para titulação de isoaglutininas, pretendeu-se identificar os dadores de plaquetas de aférese do grupo O com alto título de isoaglutininas, no sentido de assegurar a qualidade e segurança transfusional aquando de situações de transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis.

A quantidade de anticorpo transfundido parece ser o factor mais importante para determinar a ocorrência de hemólise nas situações de transfusão de componentes plaquetários com plasma incompatível com o receptor no sistema ABO. Considera-se que existe incompatibilidade ABO *minor* quando um doente do grupo sanguíneo A, B ou AB é transfundido com componentes sanguíneos do grupo O. Apesar de serem múltiplos os factores que podem influenciar o título de isoaglutininas no indivíduo, normalmente este título é baixo e a diluição plasmática que ocorre após transfusão incompatível e a neutralização por substâncias A e B solúveis no receptor evitam as reacções graves.

A hemólise clinicamente significativa é uma complicação rara da administração de plaquetas com plasma incompatível. Produtos plaquetários de dadores de grupo O, e em particular dadores de Aférese, são os mais frequentemente implicados nestas reacções. A presença de altos títulos de isoaglutininas anti-A, anti-B ou anti-A,B em alguns dadores do grupo O pode ser a causa da hemólise com consequente reacção transfusional.

Apesar de o grupo ABO não ser considerado uma barreira impeditiva na transfusão de produtos plaquetários, a gravidade de algumas reacções transfusionais descritas na literatura nos últimos anos tornou pertinente que os serviços de Imunohemoterapia definissem claramente uma política para a transfusão de plaquetas com incompatibilidade ABO. O estabelecimento de guias de actuação pode passar por identificar os dadores com alto título de isoaglutininas anti-A e anti-B. Esta determinação é particularmente importante para os dadores de aférese, porque a quantidade de plasma incompatível e, consequentemente, a quantidade de anticorpo infundido, será sempre superior à que ocorre em plaquetas obtidas por dádiva de sangue total, na qual ocorre diluição com outros componentes plaquetários de outros dadores com diferentes títulos de isoaglutininas.

Com alguma experiência na técnica de titulação de isoaglutininas e com boa correlação clínica nas situações de transplantes de progenitores hematopoiéticos ABO *minor* incompatíveis, decidiu-se neste estudo recorrer à técnica de titulação de isoaglutininas e tentar classificar os dadores em dadores de “alto” ou “baixo” título. Para tal, este estudo baseou-se não só em casos descritos na literatura, na qual a metodologia foi semelhante à utilizada por nós, mas também mediante a avaliação indirecta dos efeitos da transfusão de plasma incompatível no receptor. Assim este estudo teve dois principais objectivos:

- Proceder à titulação de isoaglutininas anti-A e anti-B da classe IgG em dadores de Concentrados Plaquetários de Aférese (CP-A) do grupo sanguíneo O, do Serviço de Medicina Transfusional do Departamento de Imuno-Hemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto;
- Determinar a partir de que título a transferência passiva de isoaglutininas por transfusão adquire significado clínico em doentes do grupo A, B ou AB transfundidos com os CP-A de título conhecido.

De acordo com os resultados obtidos, foi definido um terceiro objectivo:

- Classificar os dadores estudados em dadores de “alto” ou “baixo” título de isoaglutininas, no sentido de auxiliar a decisão de transfundir o CP-A em receptores do grupo sanguíneo A, B ou AB, sempre que necessário.

Este trabalho consistiu num estudo descritivo observacional prospectivo, realizado em duas etapas independentes mas inter-relacionadas:

- a) Titulação de isoaglutininas anti-A₁ e anti-B da classe IgG;
- b) Avaliação do significado clínico da transferência passiva de isoaglutininas.

Até ao momento nenhum trabalho conseguiu tornar possível identificar claramente os dadores O com alto título de isoaglutininas que possam adquirir significado clínico em termos de reacção transfusional, razão pela qual foi considerado de grande interesse e utilidade o desenvolvimento deste trabalho para a criação de uma metodologia simples de classificação dos dadores de plaquetas por aférese do grupo sanguíneo O.

MATERIAL E MÉTODOS

A) TITULAÇÃO DE ISOAGLUTININAS

População e amostra

A população deste estudo consistiu na totalidade de dadores activos de CP-A do grupo sanguíneo O inscritos no Serviço de Medicina Transfusional do IPO-Porto. Consideram-se dadores activos de CP-A aqueles que apresentam dádivas regulares com um intervalo mínimo de 1 mês entre dádivas, durante o ano antecedente, e que se espera que se dirijam às instalações do IPO-Porto para contribuir com a sua dádiva durante o ano subsequente. Actualmente, o IPO-Porto tem 469 dadores de CP-A activos, dos quais 172 são do grupo sanguíneo O.

A amostragem consistiu em dadores de CP-A do grupo O que contribuíram com a sua dádiva de CP-A entre 1 de Junho e 30 de Novembro de 2010 (6 meses). Neste período, foram estudados 83 dadores de CP-A do grupo.

Caracterização da população

A dádiva de CP-A no IPO-Porto é realizada de acordo com os critérios gerais de selecção de dadores de CP-A. Para a colheita de Plaquetas por Aférese, estes dadores devem apresentar, entre as características comuns a um dador de sangue total:

- Bons acessos venosos periféricos;
- Valores de plaquetas pré-dádiva superiores a $150 \times 10^9/\mu\text{L}$;
- Duas dádivas de sangue total (ou pelo menos uma no DIH do IPO-Porto);
- Ausência de aloanticorpos irregulares;
- Ausência de história de ingestão de anti-inflamatórios não esteróides ou ácido acetilsalicílico nos 5 dias anteriores à dádiva.
- Ausência de historial de hemorragias;
- Preferencialmente dadores do sexo masculino.

Colheita das amostras

As amostras foram colhidas em tubo seco sem anticoagulante, para obtenção de soro. Este tipo de amostra foi seleccionado com o objectivo de estudar apenas as IgG, dado que o C3d é consumido na formação do coágulo.

Processamento das amostras

A metodologia usada na rotina laboratorial diária do Serviço de Medicina Transfusional do IPO-Porto é a metodologia de hemaglutinação em microcoluna de gel, que se caracteriza por uma alta sensibilidade, alta especificidade, fácil leitura e interpretação dos resultados. Esta metodologia é disponibilizada pela casa comercial Diamed® (Diamed; Suíça, Cressier), que apresenta *cards* e reagentes monoespecíficos e poliespecíficos para cada tipo de teste. Os *cards* “LISS/Coombs” são compostos por um gel impregnado com antglobulina humana poliespecífica, capaz de detectar IgG e C3d.

Para a titulação de isoaglutininas, foram seguidas as instruções mencionadas no Manual Técnico da *American Association of Blood Banks (AABB)*. Todos os testes foram executados manualmente, com recurso a pipetas calibradas e reagentes monoespecíficos e poliespecíficos.

O procedimento iniciou-se pela execução manual de diluições seriadas do soro das amostras a testar, de 1:2 até 1:1024. Seguidamente, foram pipetadas suspensões de eritrócitos A₁ e B a 2-5% do reagente comercial “ABO/I-II” (Diamed; Suíça, Cressier) para *cards* “LISS/Coombs” (Diamed; Suíça, Cressier) devidamente marcados com as diluições mencionadas e aos quais se adicionou igual volume de soro da amostra previamente diluído no respectivo micropoço. Após incubação de 15 minutos a 37°C em estufa com temperatura controlada, os *cards* foram centrifugados durante 10 minutos a 910 rpm em centrífuga apropriada, sendo lidos e interpretados os resultados de seguida.

Controlo de qualidade interno do procedimento

Como controlo de qualidade interno do procedimento, foram determinados os títulos de isoaglutininas em 2 amostras de plasma de CP-A do grupo sanguíneo AB (usadas como controlo negativo e como controlo da especificidade do ensaio) e 8 amostras de CP-A do grupo O seleccionadas aleatoriamente (10% do total), a partir das quais os testes foram repetidos para avaliar a congruência com o primeiro resultado.

Leitura e interpretação dos resultados

Os resultados foram considerados positivos perante observação de aglutinação macroscópica na microcoluna de gel, como mostra a Fig. 5.

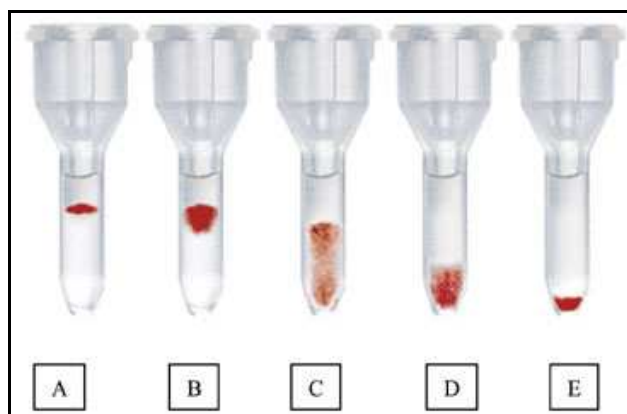


Fig. 5 – Intensidades de aglutinação macroscópica pela metodologia de hemaglutinação em gel (A a D: aglutinação com intensidades de reacção de 4+ a 1+, respectivamente; E: sem aglutinação). Adaptado de Medscape.com

Considerou-se “título de isoaglutininas” o inverso do valor da última diluição na qual se observou aglutinação macroscópica (tomando como exemplo a Fig. 5, e associando-se a valores de diluição, o valor do micropoço assinalado com “D” seria considerado o título de isoaglutininas presente na amostra).

Registo de resultados

Os resultados foram registados numa folha de cálculo em Excel, englobando dados como número de dador, género, idade, número de colheita, data de colheita, data de processamento das amostras e título de anti-A₁ e anti-B da classe IgG.

Análise estatística de resultados

A análise estatística foi efectuada no programa informático *SPSS Statistics (v. 17.0)*, analisando-se as frequências absolutas e relativas de títulos de isoaglutininas, e a média e o desvio padrão de idades dos dadores. Verificou-se ainda se existiam ou não diferenças estatisticamente significativas no título de anti-A₁ e anti-B entre os indivíduos do grupo sanguíneo O Rh(D) Positivo e O Rh(D) Negativo, assim como o género dos dadores entre o grupo sanguíneo O Rh(D) Positivo e O Rh(D) Negativo, usando o teste t-student. Foi considerado como significativo $p < 0,05$.

B) AVALIAÇÃO DO SIGNIFICADO CLÍNICO DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ISOAGLUTININAS

População e amostra do estudo

Nesta etapa do estudo, a população consistiu na totalidade de doentes do grupo sanguíneo A, B e AB que foram transfundidos com componentes plaquetários do grupo sanguíneo O.

A amostra era composta por doentes do grupo A, B ou AB transfundidos com CP-A do grupo O colhidos no IPO-Porto, entre 1 de Junho e 30 de Novembro de 2010. Neste período, foram estudados 21 casos, correspondentes a 12 doentes. Foram seleccionadas apenas amostras de doentes com um intervalo de tempo máximo de 24 horas entre a transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis e a recepção de novo pedido de transfusão (de concentrados de eritrócitos ou de plaquetas).

Colheita e selecção das amostras

As amostras para esta fase do estudo foram colhidas em tubos com o anticoagulante EDTA.

A selecção baseou-se nos pedidos de transfusão recepcionados no Laboratório de Imunohematologia do nosso serviço. As amostras (pré-transfusão e até 24 horas após a transfusão de CP-A) foram colhidas em tubos com o anticoagulante EDTA. Foram utilizadas amostras recepcionadas no Laboratório de Imunohematologia aquando do pedido simultâneo de transfusão de Concentrados de Eritrócitos e amostras recolhidas do Laboratório de Hematologia Laboratorial do Departamento de Patologia Clínica do IPO-Porto.

Processamento das amostras

O Teste de Antiglobulina Directo (TAD) foi executado nas amostras pré-transfusionais e até 24 horas após a transfusão de CP-A. Os testes foram realizados manualmente, com base na metodologia em microcoluna de Gel (Diamed; Suíça, Cressier). Foram utilizados *cards* "LISS/Coombs" (Diamed; Suíça, Cressier), para os quais foram pipetados 50 µL de suspensão a 2-5% de células da amostra em Diluente 2 (Diamed; Cressier, Suíça), seguindo-se uma centrifugação durante 10 minutos a 910 rpm, em centrífuga apropriada.

Nas amostras que revelaram TAD positivo na amostra 24 horas após transfusão de CP-A ABO *minor* incompatível, identificou-se a classe de imunoglobulina (IgG, IgA ou IgM) ou de Complemento (C3d ou C3c). Para este efeito, utilizaram-se *cards* ID-Screening I (Diamed; Suíça, Cressier). Para estes *cards* foram pipetados 50 µL de suspensão a 2-5% de células da amostra em Diluente 2 (Diamed; Cressier, Suíça), seguindo-se uma centrifugação durante 10 minutos a 910 rpm, em centrífuga apropriada.

Perante a presença de um TAD positivo por IgG após transfusão do CP-A (sendo o resultado do TAD anterior à transfusão negativo), efectuou-se o Eluado Eritrocitário na amostra pós-transfusional. Para tal, foi utilizado o *kit* comercial Elukit® (Immucor Gamma; USA, Norcross), de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* é composto por uma solução de lavagem, uma solução tampão e uma solução de eluição, para eluição ácida dos anticorpos adsorvidos aos eritrócitos.

Leitura e interpretação dos resultados

As reacções foram consideradas positivas perante observação macroscópica de aglutinação de eritrócitos no topo ou ao longo da microcoluna de gel (interpretando-se o resultado entre 4+ e 1+, respectivamente, como mostra a Fig. 5). Um resultado foi considerado negativo perante observação de um botão concentrado de eritrócitos no fundo do micropoço.

Registo dos resultados

Os resultados foram registados numa base de dados criada em folha de cálculo Excel, englobando dados relativos ao CP-A transfundido (grupo sanguíneo e título de anti-A₁ e anti-B da classe IgG), assim como dados relativos ao doente (data de transfusão, idade e grupo sanguíneo do doente, número de plaquetas, hemoglobina e resultado do TAD antes e após transfusão do CP-A ABO *minor* incompatível).

Controlo interno do processo

Como forma de controlo interno e de especificidade do teste, efectuou-se o Eluado Eritrocitário em 2 amostras (10%) com resultado TAD Negativo após a transfusão.

Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi efectuada no programa informático *SPSS Statistics* (v. 17.0). Para além da caracterização da média e desvio padrão das idades dos doentes verificou-se, com base no teste t para amostras emparelhadas, se existiam diferenças estatisticamente significativas entre:

- Os valores de hemoglobina pré e pós-transfusionais
- Os valores de plaquetas pré e pós-transfusionais

Análise retrospectiva de casos

O número de casos de transfusões de plaquetas ABO *minor* incompatíveis com efeitos secundários graves, nomeadamente reacções transfusionais hemolíticas, tem-se revelado insuficiente para tirar conclusões acerca dos riscos associados a esta prática.

Algumas referências bibliográficas relatam casos de reacções mais ou menos graves, acreditando-se que estas possam ocorrer com maior gravidade quanto maior for o título de isoaglutininas presentes nos componentes plaquetários.

Com o objectivo de alargar o número de casos analisados foi introduzida, neste estudo, uma análise retrospectiva de casos de transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis. Para tal, e com base nos 83 dadores de CP-A do grupo O com título de isoaglutininas previamente determinado, pesquisou-se os doentes que receberam transfusão de componentes destes dadores, entre 1-1-2009 e 31-12-2010 (2 anos). Destes doentes, foram seleccionados os do grupo sanguíneo A, B ou AB para análise. Para esta consulta, recorreu-se à aplicação informática *SIBAS* (*Sistema Integrado de Bancos de Sangue*) (v. 2.0.5), que gere toda a informação referente à prática transfusional do Serviço de Medicina Transfusional do Departamento de Imunohemoterapia do IPO-Porto. Nos referidos doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB, verificou-se quais os que apresentaram TAD positivo por IgG após a transfusão dos CP-A do grupo O.

RESULTADOS

A) TITULAÇÃO DE ISOAGLUTININAS

Caracterização dos dadores

Dos 83 dadores estudados, 47 (56,6%) pertenciam ao sexo feminino e 36 (43,4%) ao sexo masculino, com idade média de 41,2 ($\pm 11,9$ anos). Verificou-se ainda que 15 (18,1%) correspondiam ao grupo O Rh (D) Negativo e 68 (81,9%) ao grupo O Rh (D) Positivo. Verificou-se também que todos os dadores estudados apresentavam Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) Negativa.

Controlo interno do processo

Das 2 amostras de plasma AB utilizadas como controlo da especificidade do processo, os resultados revelaram-se negativos, como esperado, confirmando-se a inexistência de isoaglutininas anti-A e anti-B em suspensão. Das 8 amostras ($\approx 10\%$ do total das amostras) repetidas em duplicado, todos os segundos resultados foram congruentes com os primeiros.

A Fig. 6 apresenta o resultado da titulação de uma das amostras dos dadores estudados, cujos títulos de anti-A₁ e anti-B foram de 256 e 32, respectivamente.

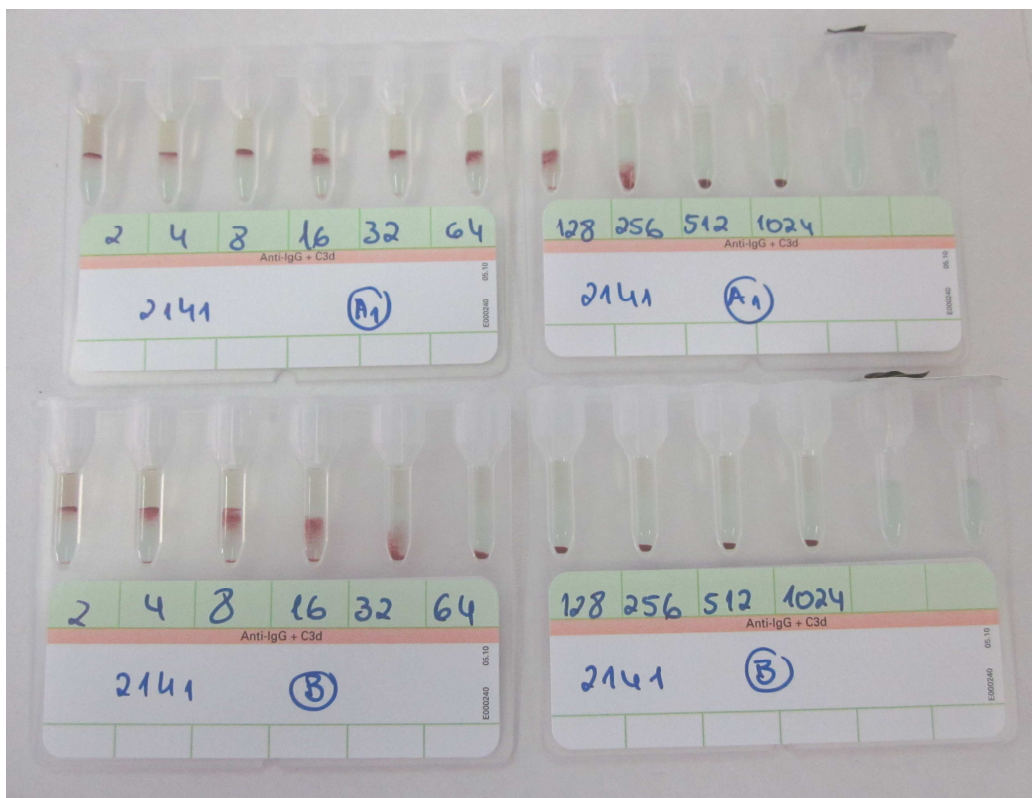


Fig. 6 – Amostra de um dador com título de anti-A₁ e anti-B de 256 e 32, respectivamente.

Análise do título de isoaglutininas anti-A₁

As frequências absolutas obtidas para a titulação de isoaglutininas anti-A₁ da classe IgG encontram-se resumidas na Fig. 7, onde se verifica que o título de anti-A₁ mais frequente foi de 128 (24,8%), seguido de 256 (21,7%), 64 (19,3%), 32 (14,5%), 512 (7,2%), 16 e 1024 (4,8%), 2048 (2,4%) e 8 (1,2%). Considerando valores ≥ 256 como alto título, verificou-se que, dos 83 dadores, 21 (25,3%) apresentaram alto título de anti-A₁.

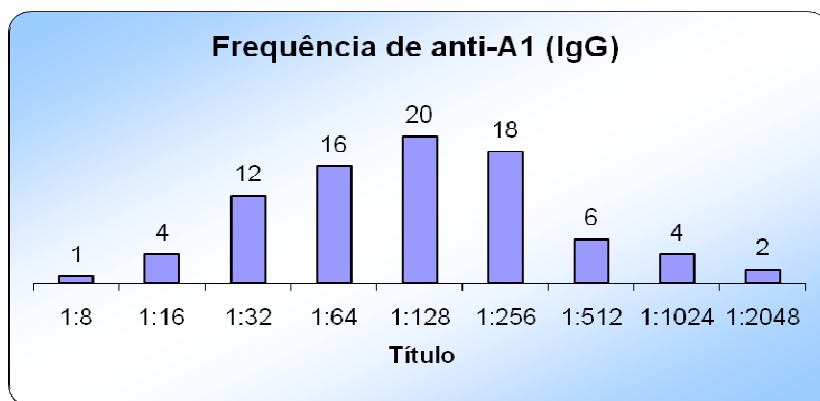


Fig. 7 – Frequência absoluta dos títulos de isoaglutininas anti-A₁ da classe IgG.

Análise do título de isoaglutininas anti-B

As frequências absolutas obtidas para a titulação de isoaglutininas anti-B da classe IgG encontram-se resumidas na Fig. 8, onde se verifica que o título de anti-B mais frequente foi de 64, seguido de 128 (19,3%), 16 e 32 (13,3%), 256 (10,8%), 8 (7,2%), 1024 (4,8%), 512 (3,6%) e finalmente 2 e 4 (1,2%). Considerando valores ≥ 256 como alto título, verificou-se que, dos 83 dadores, 8 (9,6%) apresentavam alto título de anti-B.

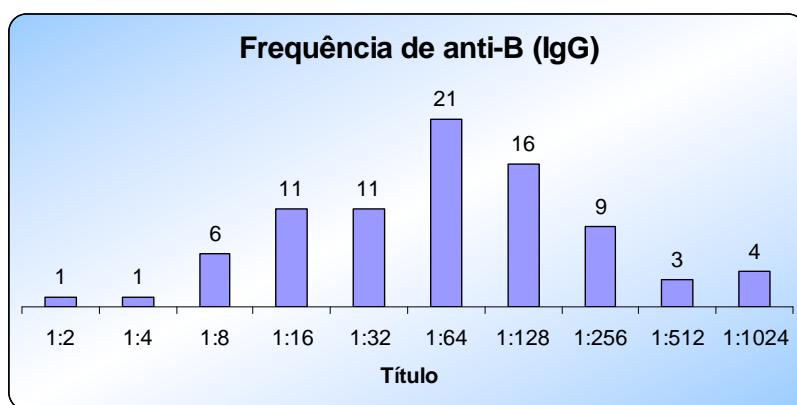


Fig. 8 – Frequência absoluta dos títulos de isoaglutininas anti-B da classe IgG.

Na globalidade dos 83 dadores, observou-se uma percentagem de 43,3% de dadores com alto título de isoaglutininas anti-A₁ e/ou anti-B.

Análise estatística dos resultados

Estatisticamente, não foram encontradas diferenças significativas entre os títulos de anti-A₁ e anti-B e o grupo sanguíneo O Rh(D) Negativo e O Rh(D) Positivo, como representado na Fig.9.

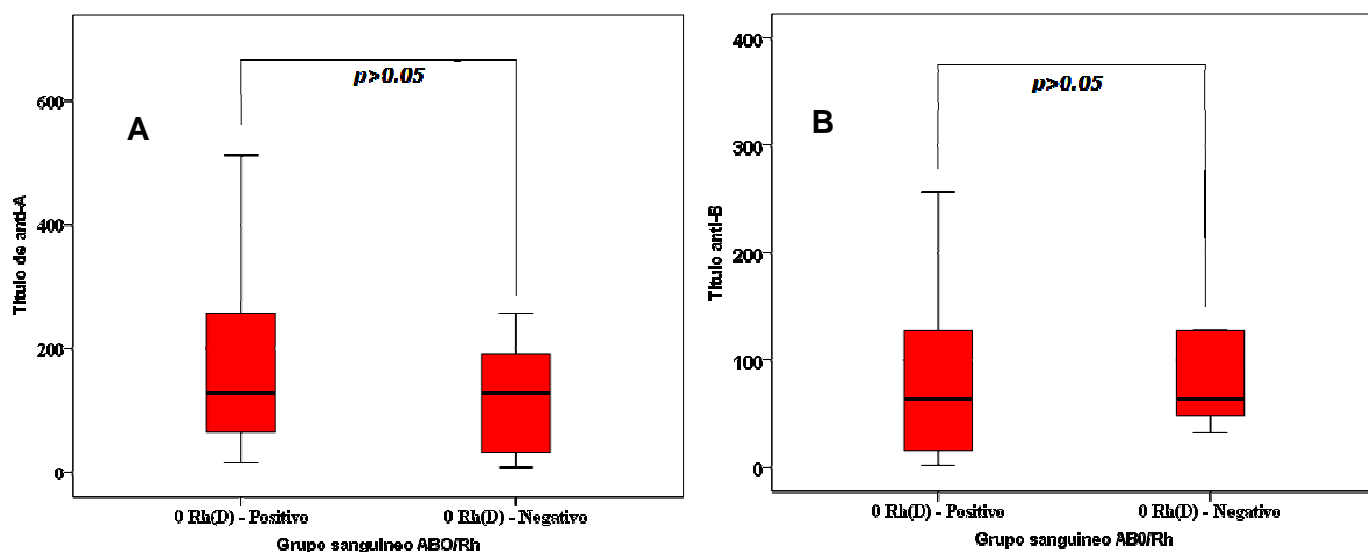


Fig. 9 – Títulos de anti-A₁ (A) e anti-B (B) por grupo sanguíneo dos dadores.

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o género e os títulos de anti-A₁ e anti-B, nos dadores estudados (Fig. 10).

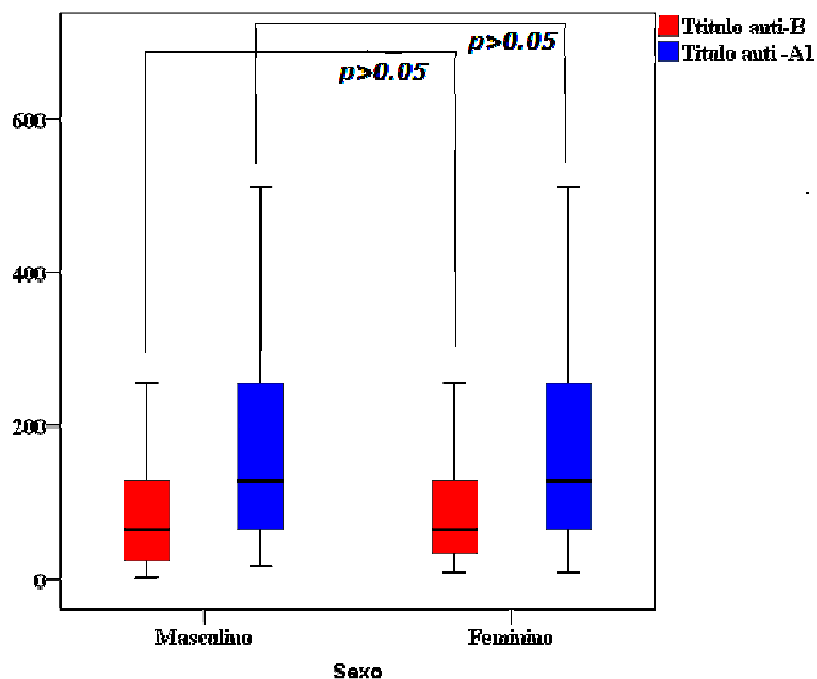


Fig. 10 – Títulos de anti-A₁ e anti-B por género dos indivíduos analisados.

B) AVALIAÇÃO DO SIGNIFICADO CLÍNICO DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ISOAGLUTININAS

Caracterização dos doentes estudados

Os 21 casos estudados correspondiam a 12 doentes, dado que alguns foram transfundidos mais do que uma vez com CP-A do grupo O, em diferentes datas, como se pode observar na tabela VI. Estes doentes apresentavam uma idade média de 54,75 (\pm 17,01 anos) e várias patologias, maioritariamente do foro onco-hematológico (50% encontravam-se diagnosticados com Linfoma Não Hodgkin (LNH), 16,6% com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e 8,3% com carcinoma de localização desconhecida (CLD), carcinoma da faringe, MM (Mieloma Múltiplo) e aplasia medular). Dos 12 doentes, 42,9% pertenciam ao grupo A Rh(D) Positivo, 4,8% sanguíneo ao grupo A Rh(D) Negativo, e 9,5% ao grupo B Rh(D) Positivo.

Caracterização dos dadores dos CP-A administrados durante o estudo

Verificou-se que, dos 21 CP-A do grupo O administrados durante o estudo, 4 (19%) pertenciam a dadores apenas com alto título de anti-A₁, 2 (9,5%) pertenciam a dadores apenas com alto título de anti-B e 5 (23,8%) pertenciam a dadores com alto título de anti-A₁ e anti-B em simultâneo. Os restantes 10 (47,6%) dadores foram considerados dadores de “baixo título”, por apresentarem títulos de isoaglutininas inferiores ou iguais a 128.

No total, foram administrados 11 CP-A de dadores com alto título de isoaglutininas, correspondente a 52,4% dos casos. Destes 11 CP-A, 14,3% eram do grupo O Rh(D) Negativo e 85,7% do grupo O Rh(D) Positivo. Apesar da administração destes 11 CP-A de dadores de alto título, não foi relatada nenhuma reacção transfusional.

Tabela VI – Quadro resumo dos doentes estudados, para avaliação do significado clínico da transferência passiva de isoaglutininas

Doente	Idade doente (anos)	Grupo sanguíneo doente	Data Transfusão	Grupo sanguíneo dador	Título anti-A ₁	Título anti-B	TAD antes	TAD depois	Eluado	Nº PLT antes (x10 ⁹ /L)	Nº PLT depois (x10 ⁹ /L)	Patologia primária	Hemoglobina antes (g/dL)	Hemoglobina depois (g/dL)
1	53	A Rh(D) Positivo	11-06-2010	O Rh(D) Positivo	1:32	1:16	Neg	Neg		7	11.	LNH	10	9,4
2	49	A Rh(D) Positivo	11-06-2010	O Rh(D) Positivo	1:64	1:64	Neg	Neg		5	3	LMA	7,1	7,4
			14-10-2010	O Rh(D) Positivo	1:512	1:64	Neg	Neg	Neg	3	8		8	7,6
			16-10-2010	O Rh(D) Negativo	1:128	1:128	Neg	Neg		16	18		8,7	6,9
3	48	A Rh(D) Positivo	11-06-2010	O Rh(D) Negativo	1:64	1:256	Neg	Neg		9	37	LNH	7,6	8,7
			11-11-2010	O Rh(D) Negativo	1:128	1:32	Neg	Neg		16	24		10,7	9,4
4	58	B Rh(D) Positivo	12-06-2010	O Rh(D) Positivo	1:128	1:256	Neg	++ (IgG)	Neg	44	93	CLD	9	9,5
5	64	B Rh(D) Positivo	02-06-2010	O Rh(D) Positivo	1:32	1:128	Neg	Neg		50	46	LNH	11,9	10,9
			13-09-2010	O Rh(D) Positivo	1:1024	1:512	Neg	+ (C3d)		12	15		10,7	10,1
			17-09-2010	O Rh(D) Positivo	1:256	1:128	Neg	Neg		17	21		9	8,6
			29-09-2010	O Rh(D) Positivo	1:256	1:1024	Neg	Neg		42	40		7,8	9,4
6	60	A Rh(D) Positivo	29-06-2010	O Rh(D) Positivo	1:512	1:256	Neg	Neg		48	36	LNH	10	9,1
7	57	A Rh(D) Positivo	13-09-2010	O Rh(D) Positivo	1:256	1:64	Neg	Neg		20	37	LMA	7,8	6,7
			18-10-2010	O Rh(D) Positivo	1:64	1:16	Neg	+/- (IgG)	anti-A1	10	36		7,9	7,8
			17-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:1024	1:512	Neg	+ (IgG)	Neg	15	26		8,9	7,7

Transferência Passiva de isoaglutininas em transfusão de plaquetas ABO Minor incompatíveis

8	83	A Rh(D) Positivo	3-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:32	1:128	Neg	+ (IgG)	Neg	6	7	LNH	7,1	7
9	39	A Rh(D) negativo	29-10-2010	O Rh(D) Positivo	1:32	1:16	Neg	Neg		17	78	LNH	8,1	9
10	77	A Rh(D) Positivo	9-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:64	1:128	Neg	Neg	Neg	23	12	Ca faringe	9,5	9,1
			9-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:16	1:8	Neg	Neg		23	12		9,5	9,1
11	52	A Rh(D) Positivo	16-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:512	1:256	Neg	Neg		12	36	MM	7,7	8,1
12	17	AD	15-11-2010	O Rh(D) Positivo	1:256	1:32	Neg	+ (C3d)		20	32	Aplasia Medular	8,4	7

Legenda: C3d – Proteína de complemento; Ca faringe – Carcinoma da Faringe; CLD – Carcinoma de localização desconhecida; IgG – Imunoglobulina G; LNH – Linfoma não-Hodgkin; LMA – Leucemia Mielóide Aguda; MM – Mieloma Múltiplo; Nº PLT antes – Número de plaquetas antes da transfusão de CP-A ABO *minor* incompatíveis; Nº PLT depois – Número de plaquetas até 24 após a transfusão de CP-A ABO *minor* incompatíveis; TAD – Teste de Antiglobulina Directo;

Resultados

Análise dos casos de TAD positivo por IgG após transfusão

Dos 21 casos estudados, apenas 4 revelaram TAD positivo por IgG após transfusão de CP-A do grupo O, sendo esse resultado negativo antes da transfusão (doentes 4, 7 e 8). Os CP-A infundidos nestes 4 casos correspondiam a doadores com títulos de anti-A₁ entre 32 e 1024 e títulos de anti-B entre 16 e 512.

O doente 4, de 58 anos, pertencente ao grupo sanguíneo B Rh(D) Positivo e diagnosticado com um carcinoma de localização desconhecida, foi transfundido com um CP-A do grupo O com os títulos de anti-A₁ e anti-B de 128 e 256, respectivamente. Após esta transfusão, o TAD revelou-se positivo por IgG, sendo este resultado previamente negativo. O eluado eritrocitário revelou-se negativo após a transfusão. O doente não apresentou reacções transfusionais, o valor de hemoglobina aumentou 0,5 g/dL em 24 horas e a contagem plaquetária aumentou.

O doente 7, de 57 anos, pertencente ao grupo sanguíneo A Rh(D) Positivo e diagnosticado com Leucemia Mielóide Aguda, foi transfundido com 3 CP-A do grupo O em diferentes datas, durante o estudo. O dador do primeiro CP-A, transfundido a 13-9-2010, apresentava títulos de anti-A₁ e anti-B de 256 e 64, respectivamente. Após esta transfusão, o TAD manteve-se negativo. Embora o doente não tenha apresentado reacções transfusionais hemolíticas, o valor de hemoglobina diminuiu 1,1 g/dL em 24 horas. Por outro lado, a contagem plaquetária aumentou. O dador do segundo CP-A, transfundido a 18-10-2010, apresentava títulos de anti-A₁ e anti-B de 64 e 16, respectivamente. Após a transfusão, o TAD revelou-se positivo por IgG, sendo este resultado previamente negativo. O eluado eritrocitário revelou a presença de isoaglutininas anti-A₁ adsorvidas aos eritrócitos do doente. No entanto, o doente não manifestou reacções transfusionais, o valor de hemoglobina pós-transfusional diminuiu apenas 0,1 g/dL e a contagem plaquetária aumentou substancialmente. O dador do terceiro CP-A, transfundido em 17-11-2010, apresentava alto título de anti-A₁ e anti-B em simultâneo (1024 e 512, respectivamente). O resultado do TAD revelou-se positivo por IgG após a transfusão, quando este era previamente negativo. O resultado do eluado eritrocitário revelou-se negativo. Apesar da presença de alto título de isoaglutininas, o doente não manifestou qualquer reacção transfusional hemolítica, embora o valor de hemoglobina tenha diminuído 1,2 g/dL em 24 horas. Também neste caso, a contagem plaquetária aumentou.

O doente 8, de 83 anos, pertencente ao grupo sanguíneo A Rh(D) Positivo e diagnosticado com Linfoma Não-Hodgkin, foi transfundido com um CP-A do grupo O cujo dador apresentava títulos de anti-A₁ e anti-B de 32 e 128, respectivamente. Apesar de o TAD se ter revelado positivo 24 horas após a transfusão quando este era previamente negativo, o eluado eritrocitário revelou-se negativo. A contagem plaquetária aumentou e o valor de hemoglobina diminuiu 0,1 g/dL.

Análise da contagem plaquetária pós-transfusional

Dos 21 casos analisados, verificou-se que, em 15 casos (71,4%), os doentes responderam com aumento da contagem plaquetária pós-transfusional. Nenhum dos doentes que apresentaram TAD positivo após transfusão de CP-A do grupo O revelou decréscimo na contagem plaquetária.

Controlo interno do processo

Dos 6 eluados eritrocitários estudados, 2 foram executados em amostras com TAD negativo após a transfusão, como forma de controlo da especificidade do processo, e 4 foram executados por se tratarem de amostras que revelaram TAD positivo por IgG após transfusão dos CP-A do grupo O, sendo este resultado previamente negativo. Destes 4 eluados, apenas 1 revelou a presença de isoaglutininas anti-A₁ após a transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis. Os títulos de anti-A₁ e anti-B associados ao CP-A transfundido foram 64 e 16, respectivamente. A presença de anti-A₁ não se revelou com significado clínico, pelo que não foi possível tirar conclusões acerca da relação entre o título de isoaglutininas e o significado clínico da sua transferência passiva.

Análise da concentração de hemoglobina pré e pós-transfusional

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de hemoglobina antes e depois da transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis. No entanto, é possível observar que existe uma tendência para a diminuição dos valores de hemoglobina após a transfusão. Dado que não foram estudadas outras variáveis, não é possível concluir-se que esta diminuição está apenas relacionada com uma possível hemólise ligeira provocada pelas isoaglutininas presentes no CP-A. Consultando a tabela VI, é ainda possível observar que o decréscimo de 1g/dL após a transfusão ocorreu sempre em doentes com patologias do foro oncohematológico que, só por si, já são um grupo com algumas particularidades, pelo facto de serem doentes imunodeprimidos e politransfundidos.

Análise retrospectiva de casos

Entre 1-1-2009 e 31-12-2010, foram colhidas 1807 unidades de CP-A no SMT do IPO-Porto de diferentes grupos sanguíneos. Para fazer face ao elevado número de doentes com necessidade de componentes plaquetários, a nossa instituição recorreu a este tipo de componentes colhidos em entidades externas. Assim, no total, foram administrados 3467 CP-A de diferentes grupos sanguíneos. Destes, 1583 dádvas eram CP-A do grupo O. Nestes 2 anos, os 83 dadores do grupo O avaliados durante o estudo efectuaram 844 dádvas, das quais 95 foram administradas em doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB. Analisando os 95 casos, foi possível verificar que 18 doentes apresentaram TAD positivo por IgG após a transfusão dos CP-A. Nestes 18 doentes, não foram registados eluados eritrocitários reactivos, nem foi relatada nenhuma reacção transfusional hemolítica pós-transfusional.

DISCUSSÃO

A titulação de isoaglutininas é um procedimento imunohematológico com poucas indicações para realização nos Serviços de Imunohemoterapia. Esta será uma das razões pela qual a técnica não se encontra ainda padronizada. É realizada nas situações em que, por motivos clínicos, se torna importante a sua execução, nomeadamente em casos de transplantes de progenitores hematopoiéticos com incompatibilidade *minor* no sistema ABO e ainda para estudo de reacções hemolíticas após transfusão de plaquetas ABO incompatíveis.

Existem variáveis que podem afectar os resultados da titulação e, como tal, devem estar presentes alguns cuidados, tais como: 1) devem ser utilizados grandes volumes, começando por calcular o volume necessário de soro a pipetar para cada diluição e adequando esse volume à metodologia utilizada; 2) as pipetas devem estar calibradas e, sempre que possível, possuir pontas de fácil remoção, para facilitar a rejeição após cada diluição e evitar contaminações cruzadas; 3) a concentração da suspensão de eritrócitos de antigenicidade conhecida deve ser adequada à metodologia utilizada; 4) o tempo e a temperatura de incubação e a força de centrifugação devem ser consistentes para todos os testes. Como tal, a implementação de uma técnica automatizada na rotina diária do laboratório de Imunohematologia poderia facilitar a determinação da titulação de isoaglutininas.

Vários estudos têm sido desenvolvidos em diferentes populações, com o objectivo de caracterizar dadores e avaliar o seu título de isoaglutininas anti-A e anti-B circulantes. Este estudo revelou-se útil para a caracterização de uma amostra de dadores de CP-A do grupo sanguíneo O que, voluntariamente, se deslocaram ao Serviço de Medicina Transfusional do IPO-Porto para contribuir com a sua dádiva. Até à data, ainda não existia nenhum estudo semelhante nesta instituição.

Nos 83 dadores estudados, o título mais frequente de anti-A₁ (128) foi superior ao título mais frequente de anti-B (64), resultados coincidentes com os do gráfico apresentado na Fig. 2. Considerando valores ≥ 256 como alto título, verificou-se que 43,3% poderiam ser considerados “dadores perigosos”. Comparativamente com um dos estudos publicados por Cassandra Josephson em 2004 ⁽³¹⁾, podemos verificar que os nossos resultados são semelhantes aos seus resultados. Para além de também ter sido utilizada a metodologia em gel, os investigadores deste estudo detectaram 30 a 40% de dadores de alto título, equiparando-se aos 43,3% detectados no nosso estudo.

Relativamente à **avaliação do significado clínico da transferência passiva de isoaglutininas**, o número de casos estudados revelou-se insuficiente para tirar conclusões acerca do título crítico de isoaglutininas a partir do qual a sua transferência passiva adquire

significado clínico, com risco de reacções transfusionais hemolíticas. Durante todo o período deste estudo, não foram relatadas quaisquer reacções transfusionais sugestivas de hemólise.

Dos 6 eluados eritrocitários analisados, apenas 1 revelou a presença de anti-A₁ após transfusão de CP-A ABO *minor* incompatível. O CP-A transfundido apresentava título de isoaglutininas de anti-A₁ de 64 e anti-B de 16. O doente associado à transfusão deste CP-A não revelou reacções transfusionais hemolíticas, o seu valor de hemoglobina diminuiu apenas 0,1g/dL em 24 horas e o número de plaquetas aumentou de $10 \times 10^9/L$ para $36 \times 10^9/L$. De referir ainda que o doente se encontrava diagnosticado com Leucemia Mielóide Aguda e, durante o estudo, foi transfundido com três CP-A do grupo O, que também foram incluídos na titulação de isoaglutininas deste estudo. Pela observação destes factos, pode concluir-se que a transferência passiva de anti-A₁ não adquiriu significado clínico. Paralelamente a estudos desenvolvidos por Christoph Buchta ⁽²³⁾, onde foram relatadas reacções transfusionais em receptores de componentes plaquetários com título de isoaglutininas de 64, pode concluir-se que o título máximo de isoaglutininas para uma transfusão segura se mantém indefinido.

Este estudo poderá ter continuidade sob outras abordagens, tais como a determinação e comparação dos títulos de isoaglutininas entre os restantes tipos de componentes plaquetários, BCP e os *pool* de CP, numa tentativa de decidir qual o componente plaquetário mais seguro nos casos de transfusão de plaquetas O em doentes do grupo A, B ou AB.

Uma das recomendações do *College of American Pathologists* (CAP) e da *American Association of Blood Banks* consiste na transfusão de *pool* de CP em vez de CP-A, sempre que for necessário transfundir plaquetas ABO *minor* incompatíveis. Como já foi referido, o volume final de um CP-A pode ser ligeiramente superior ao volume de um *pool* de CP. Pelo facto de o CP-A ser colhido a apenas um dador e por os *pool* de CP serem compostos por um conjunto de 5 ou 6 dadores, pensa-se que a concentração de isoaglutininas possa ser inferior nestes, devido ao efeito de diluição. Por esta razão, considera-se que um *pool* de CP poderá apresentar menor risco de provocar reacções transfusionais hemolíticas induzidas por transferência passiva de anticorpos.

De acordo com os resultados apresentados, e seguramente devido ao reduzido número de casos observados, não foi possível concluir quanto à associação entre o título de isoaglutininas e o significado clínico da sua transferência passiva. Esta situação reflecte o cuidado do SMT do IPO-Porto em optar pelas mais correctas práticas transfusionais, evitando ao máximo a transfusão de plaquetas não-isogrupais.

Embora não tenha sido possível atingir o principal objectivo deste trabalho, o SMT do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E. propôs-se a dar continuidade ao

estudo dos seus dadores de CP-A do grupo O. As unidades de CP-A com alto título são agora rotuladas com essa indicação, sendo administradas apenas a doentes do grupo sanguíneo O. Por outro lado, a realização deste trabalho permitiu adquirir prática laboratorial no processo de titulações. Assim, previamente ao envio de um componente plaquetário não-isogrupal, passou a ser possível efectuar a titulação da(s) isoaglutinina(s) de risco para o doente e, assim, decidir acerca da transfusão desses CP-A em doentes do grupo sanguíneo A, B ou AB. Noutra abordagem, o estudo poderá ainda ser alargado a outros componentes plaquetários, nomeadamente a *pools* constituídos por 5 ou 6 concentrados plaquetários obtidos a partir de colheita de sangue total.

Desta forma, respeitam-se as exigências da *American Association of Blood Banks* e do *College of American Pathologists*, que referem que “todos os serviços de sangue devem estabelecer políticas de administração de transfusões que contêm quantidades significativas de plasma com anticorpos ABO incompatíveis (...) evitando a administração destes componentes a crianças (...) e assegurando que todos os doentes devem ser transfundidos com componentes plasmáticos compatíveis com o seu próprio grupo sanguíneo”. As mesmas instituições avançam algumas recomendações, tais como a utilização de derivados plasmáticos do grupo sanguíneo AB, para evitar reacções transfusionais hemolíticas, sempre que for necessário recorrer a transfusão de plaquetas ABO incompatíveis. No entanto, pelo facto de a sua frequência na população ser baixa (cerca de 3%), os serviços de sangue deverão criar políticas de utilização de componentes plaquetários de outros grupos sanguíneos. Outra recomendação passa pela redução de volume plasmático em casos de transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis, principalmente se infundidos em crianças e recém-nascidos.

A principal preocupação do SMT do IPO-Porto centra-se na segurança transfusional dos seus doentes. Apesar de não ter sido possível concluir acerca do título crítico de isoaglutininas, não foi possível provar que a transfusão de plaquetas ABO *minor* incompatíveis é pouco segura. No entanto, no momento de decidir qual o título crítico seguro para transfundir concentrados plaquetários não-isogrupais, é necessário atender ao risco de se perder um grande número de dádavas se for escolhido um valor baixo de titulação. Como tal, deve ser avaliado o equilíbrio entre o risco e o potencial benefício para os doentes.

Este estudo permitiu assim acrescentar mais um contributo às referências bibliográficas já existentes sobre o tema. Por se tratar de um estudo pioneiro, realizado em apenas 6 meses, deve ser ponderada a possibilidade de dar continuidade à avaliação dos efeitos da transferência passiva de isoaglutininas em transfusão de diversos componentes plaquetários e, se possível, otimizar e implementar a técnica de titulação na rotina laboratorial, preferencialmente de forma automatizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daniels G, Bromilow I. Essential Guide of Blood Groups. 2nd ed. Massachusetts (USA): Blackwell Publishing; 2007
2. Hoffman R, Furie B, McGlave P. Hematology: Basic principles and practice. 5th ed. Philadelphia (USA): Churchill Livingstone; 2008
3. Silberstein H, Anderson N. Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic principles & Practice. 1st ed. Philadelphia (USA): Churchill Livingstone; 2003
4. Cartron J.-P. Blood groups: genetics and physiology. Vox Sanguinis 2010; 5: 27-45
5. Goubran H. Blood group serology. ISBT Science Series 2009; 4: 1-5
6. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda 2005
7. Daniels G. The molecular definition of red cell antigens. ISBT Science Series 2010; 5: 300-302
8. American Association of Blood Banks. Technical Manual 16th ed. Maryland 2008.
9. Mathai, J, Sindhu PN, Sulochana PV, Sathyabhama S. Haemolysin test for characterization of immune ABO antibodies. Indian J Med Res 2003; 118:125-128
10. Metcalfe P, Watkins N A. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sanguinis 2003; 85: 240-245
11. Guerreiro TS. Refratariedade Plaquetária. ABO – Revista de Medicina Transfusional. 2007; 30: 7-30
12. Lozano M. , Cid J. The Clinical implications transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. Transfusion Medicine Reviews 2003; 1(17):57-68
13. Duran, J.A. Sistema ABO e transfusão de plaquetas. ABO – Revista de Medicina Transfusional 2008; 35: 17-21
14. Ogasawara K, Ueki J, Takenaka M. Study on the expression of ABH antigens on platelets. Blood 1993; 82: 993-999

15. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Blood group A and B determinants are expressed on platelet glycoproteins IIa, IIIa and Ib. *Thrombosis and Haemostasis* 1991; 65: 196-201
16. Skogen B, Rossebo HB, Husebekk A. Minimal expression of blood group A antigen on thrombocytes from A2 individuals. *Transfusion* 1988; 28: 456-459
17. Marwaha N, Sharma R.R. Consensus and controversies in platelet transfusion. *Transfusion and Apheresis Science* 2009; 41 : 127-133.
18. Schrezenmeier H, Höchsmann B, Wiesneth M. How do we treat? Clinical haemotherapy: platelet transfusion. *ISBT Science Series* 2010; 5: 107-113
19. Ness P.M. Platelet Transfusion. The case for Single-Donor Platelets. *Blood therapies in Medicine* 2001;1(2):41-46
20. Holland L. Role of ABO and Rh Type in Platelet Transfusion. *Labmedicine* 2006; 37 (12) : 758-760
21. Joseph C.D, Catillejo M.I, Grima K. et al. ABO-mismatched platelet transfusions : Strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfusion and Apheresis Science* 2010;42:83-88
22. Mark K., Downes K., Shulman I. Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131:909-916
23. Buchta C, Macher, M, Höcker P. Potential approaches to prevent uncommon hemolytic side effects of ABO antibodies in plasma derivatives. *Biological* 2005; 33:41-48
24. Husebekk A. Complications of the transfusion of blood and blood components. *ISBT Science Series* 2011; 6; 76-80
25. Poole J, Daniel G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Medicine Reviews* 2007; 21(1):58-71
26. Sazama K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion* 1990; 30: 583-590
27. Shanwell A., Andersson T.-M. L., Rostgaard K. Post-transfusion mortality among recipients of ABO-compatible but non-identical plasma. *Vox sanguinis* 2009; 96:316-323
28. Knight RC. Measuring IgG anti-A/B titres using dithiothreitol. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31:283-287

29. Kobayaashi T. Standardization of the assay method of anti-A/B antibody titers and its problems. International Congress Series 2006: 3-7
30. National Blood Service Transfusion Medicine Clinical Policies Group. High titre anti-A/B of donors within the National Blood Service (NBS) 2002
31. Josephson C.D, Mullis N.C, Demark C.V et al. Significant number of apheresis-derived group O platelet units have « high-titer » anti-A/A,B: implications for transfusion policy. Transfusion Practice 2004; 44:805-808
32. Sandes AF, Szulman A, Lino FL. Detecção de unidades de plaquetas por aférese do tipo O com altos títulos de isoaglutininas anti-A e anti-B e definição de título crítico seguro para transfusão. In: "30º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia/HEMO 2007"; 29 (3): 381
33. Cosechen V.S., Monteiro M.C. Frequência de aglutininas anti-A e anti-B nos doadores do grupo "O" do centro de Hematologia e hemoterapia de Guarapuava/PR. Revista Electrónica Lato Sensus 2008: 1-13
34. Gambero S et al. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. Rev. Bras. Hemat. Hemot. 2004; 26(1):28-34
35. Cooling L.L, Downs T.A, Butch S. H et al. Anti-A and Anti-B titers in pooled platelets are comparable to apheresis platelets. Transfusion 2008; 48:2106-2113
36. Shanwell A, Ringden O, Wiechel B. A study of the effect of ABO incompatible plasma in platelet concentrates transfused to bone marrow transplant recipients. Vox Sanguinis 1991; 60: 23-27